



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO

PIDCB

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS

**INHIBICIÓN DE LA FORMACIÓN DE CATARATA NUCLEAR
EXPERIMENTAL CON COMPLEJOS DE INCLUSIÓN A BASE DE
CICLODEXTRINAS Y FITOMETABOLITOS**

TESIS

**PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
OPCIÓN INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS**

PRESENTA

M.C. RITA BELTRÁN SANCHEZ

DIRECTOR DE TESIS:

D.C. MAURO MANUEL MARTÍNEZ PACHECO

CO-DIRECTOR DE TESIS:

D.C. ROSA ELVA NORMA DEL RÍO TORRES

MORELIA, MICHOACÁN, JULIO, 2024

El presente trabajo de investigación se realizó en los laboratorios de “Fisiología Celular” y “Química de Productos Naturales” del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, con la dirección de los Doctores en Ciencias Mauro Manuel Martínez Pacheco y Rosa Elva Norma del Rio Torres, con el financiamiento de la CIC de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y la beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. Becario 276791).

DEDICATORIA

A los amores de mi vida, mis princesas Irene y Carol y mi esposo Gotfried por su apoyo incondicional, por su confianza y paciencia y por estar a mi lado en todo momento ayudándome y motivándome a seguir adelante.

A mis padres Rosa y Enrique por su ejemplo, por sus consejos y la educación que me brindaron desde niña. Por darme el apoyo emocional y económico para mis estudios. Por su cariño, confianza y por amarme tanto como yo a ellos.

A mis hermanos Rosy, Cristy, Fany, Majo, Carito y Quique por su apoyo, cariño y entusiasmo.

AGRADECIMIENTOS

- A Dios por darme la oportunidad de continuar con mis estudios y por tantas bendiciones recibidas durante todos estos años.
- A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y al Instituto de Investigaciones Químico Biológicas por haberme brindado la oportunidad de formarme académicamente.
 - Al CONACyT por el apoyo económico para la realización de este trabajo.
- A mis asesores, el D.C. Mauro Manuel Martínez Pacheco y la D.C. Rosa Elva Norma del Río Torres por abrirme las puertas de sus laboratorios, por sus observaciones y asesoría durante el transcurso de este trabajo, por su paciencia y por la confianza que tuvieron en mí para realizar este proyecto.
- A mis sinodales, el D.C. Homero Reyes de la Cruz, el D.C. Daniel Godínez Hernández y el D.C. Cesar Bonofacio por sus aportaciones hechas para que este trabajo fuera mejor.
- A mis compañeros del laboratorio de Fisiología Celular en especial al M.C. Alberto Garcia Flores, D.C. Rosita, Tania, Katy, Anita, Karen, Alí, David, Normando, Jared, Vane, Celes, Emanuel y Wuilber por sus conocimientos y hacerme pasar el tiempo más ameno.
- Al equipo del laboratorio “Química de Productos Naturales” por su ayuda en la obtención de compuestos puros obtenidos de plantas.
- Al D.C. Pedro Navarro Santos por su ayuda en la realización del Docking y Dinámica Molecular
- Al D.C. Marcos Cajero Juárez por su ayuda en la realización del cultivo *ex vivo* de cristalinos de conejo.

CONTENIDO

1 INTRODUCCIÓN.....	4
2 MARCO TEÓRICO.....	9
2.1 Via de los polioles.....	9
2.1.1 Aldosa reductas.....	9
2.1.2 Sorbitol deshidrogenasa	11
2.1.3 Incremento de la incidencia de la Via de los polioles.....	12
2.2 Catarata ocular.....	13
2.3 Inhibición de la AKR1B1.....	15
2.4 Activadores de la SDH.....	16
2.5 Productos naturales vegetales.....	16
2.6 Uso de plantas medicinales.....	17
2.7 Ciclodextrinas y su uso en el área farmacéutica.....	19
3 JUSTIFICACIÓN.....	21
4 HIPÓTESIS.....	22
5 OBJETIVO GENERAL.....	23
6 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
7 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	24
8 RESULTADOS.....	25
8.1 Capítulo 1.- Compuestos purificados del género <i>Eupatorium spp.</i> y su efecto inhibidor en la Aldosa reductasa.....	25
8.2 Capítulo 2 Formación, caracterización y actividad inhibitoria a la AKR1 del complejo de inclusión β-Ciclodextrina/Metilripariocromeno A.....	52
8.3 Capítulo 3 Diterpenos tipo labdano de <i>Ageratina jocotepecana</i> como inhibidores de la aldosa reductasa.....	67
8.4 Capítulo 4 Activación de la Sorbitol deshidrogenas con compuestos obtenidos de plantas nativas de Michoacán	89
9 DISCUSIÓN GENERAL.....	99
10 CONCLUSIÓN GENERAL.....	103
11 REFERENCIAS GENERALES.....	103

RESUMEN

El daño en la visión por formación de catarata es una de las complicaciones secundarias de la *Diabetes mellitus*. Esta complicación es causa del incremento de glucosa en la sangre. La glucosa es metabolizada a sorbitol por la Aldosa reductasa (AR) y la acumulación de este compuesto es la responsable de la alteración osmótica que a la larga genera daño en las fibras cristalineanas y con ello la formación de catarata. La inhibición a la AR y la activación a la Sorbitol deshidrogenasa (SDH) son una solución a la acumulación del sorbitol. Las plantas brindan una gran cantidad de compuestos que pudieran ser usados con inhibidores de la AR (IAR) o activadores de la SDH (ASDH). Michoacán cuenta con una gran biodiversidad de especies, desafortunadamente es muy poca la información con la que se cuenta con respecto a la composición química de plantas nativas de Michoacán. Por lo anterior se propone buscar IAR y ASDH en plantas nativas de Michoacán. El Metilripariocromeno y el Ácido 13-*epi*-labdanólico son compuestos obtenidos de plantas de Michoacán que mostraron efecto IAR en un ensayo *in vitro*. Estos también presentaron inhibición a la formación de catarata en cristalinos de conejo en un ensayo *ex vivo*, desafortunadamente también presentaron irritación en los cristalinos. Entre las alternativas para proteger al cristalino de la toxicidad que generan estos inhibidores esta la formación de complejos de inclusión a base de ciclodextrinas (CD). Las CD son oligosacáridos formados por unidades de dextrosa que albergan en su interior compuestos hidrofóbicos y a su vez logran estar disueltos en un ambiente acuoso. La interacción entre una CD y su ligando no es covalente por lo que tienden a disociarse. Esta característica le da un plus al complejo, ya que logra tener una liberación prolongada y ayuda a evitar la irritación que este pudiera causar en su sitio de acción a concentraciones altas.

PALABRAS CLAVE: Aldosa reductasa, Sorbitol deshidrogenasa, Catarata ocular, Fitometabolitos, Ciclodextrinas.

ABSTRACT

Alteration to visión due to cataract formation is one of the secondary complications of Diabetes mellitus. This complication is caused by an increase in blood glucose. Glucose is metabolized to sorbitol by Aldose reductase (AR). The accumulation of this compound is the cause of the osmotic alteration that eventually generates damage to the crystalline fibers and thus the formation of cataracts. Inhibition of AR and activation of Sorbitol dehydrogenase (SDH) is a solution to sorbitol accumulation. Plants provide a large number of compounds that could be used as AR Inhibitors (ARI) or activators of SDH (ASDH). Michoacan has a great biodiversity of species. Unfortunately, there is very little information available regarding the chemical composition of plants native to Michoacán. Therefore, it is proposed to search for IAR and ASDH in native plants of Michoacán. Methylripariochromene and 13-*epi*-labdanolic acid are compounds obtained from plants from Michoacán that showed ARI effect in an in vitro assay. These compounds also presented inhibition of cataract formation in rabbit lenses in an *ex vivo* test. Unfortunately they also presented irritation in the lenses. Among the alternatives to protect the lens from the toxicity generated by these inhibitors is the formation of inclusion complexes based on cyclodextrins (CD). CDs are oligosaccharides formed by dextrose units that house hydrophobic compounds inside and at the same time manage to be dissolved in an aqueous environment. The interaction between a CD and its ligand is not covalent, so they tend to dissociate. This characteristic gives the complex a plus, since it manages to have a prolonged release and helps avoid the irritation that it could cause at its site of action at high concentrations.

1 INTRODUCCIÓN

La vía de los polioles es fundamental en la homeostasis del cristalino humano. En condiciones normoglicémicas produce y mantiene una constante concentración de sorbitol intracelular. En humanos, las enzimas que participan en la vía de los polioles son la Aldosa reductasa (AKR1B1) y la Sorbitol deshidrogenasa (SDH). La primera enzima utiliza a la glucosa como precursor del sorbitol. La segunda enzima usa al sorbitol como precursor de la fructosa (Srivastava *et al.*, 2005). Diversas condiciones ambientales y fisiológicas afectan la homeostasis del cristalino (Brownlee, 2001). Por ejemplo, la hiperglucemia crónica causa un desequilibrio osmótico. Esto produce daño celular y tisular que se manifiesta con la opacidad del cristalino (catarata) (Kathleen, 2001). (Srivastava *et al.*, 2005). A largo plazo, alteraciones como la formación de catarata son complicaciones secundarias de una de las enfermedades con mayor prevalencia en el mundo: la *Diabetes mellitus*. La inhibición de la AKR1B1 conlleva al control de los mecanismos fisiológicos que se alteran en estado de hiperglucemia. Por esto, la investigación es activa en el diseño y descubrimiento de inhibidores de la enzima Aldosa Reductasa (IAR) (Changjin Zhu, 2013). Una gran cantidad de moléculas se sintetizaron para inhibir a la AR pero pocas de ellas lograron la fase 3 de investigación en el desarrollo de un fármaco: un ensayo clínico. El epalrestat es actualmente el único IAR comercializado en algunos países asiáticos. Además de la obtención de inhibidores sintéticos, los seres vivos como las plantas son fuentes interesantes para la búsqueda de inhibidores (De la Fuente *et al.*, 2003). México posee de 20,000 a 30,000 especies vegetales. De éstas, Michoacán tiene aproximadamente 5,000. El conocimiento fitoquímico de las plantas que habitan en Michoacán es correspondiente al 5 % (Ramírez-López *et al.*, 2010). En este tópico,

donde se conjunta el conocimiento de la fisiología celular, la bioquímica enzimática y la química de los metabolitos secundarios vegetales, es en donde se realizó el presente estudio.

2 MARCO TEÓRICO

2.1 Vía de los polioles

La vía de los polioles tiene dos reacciones enzimáticas. La enzima AKR1B1 cataliza la primera reacción, la cual requiere como coenzima a la nicotinamid adenin dinucleótido fosfato reducido (NADPH), esta enzima controla la vía y el contacto con niveles alterados de glucosa es una forma de activarla. La enzima SDH cataliza la segunda reacción. Ésta transforma el sorbitol a fructosa y utiliza al nicotinamida adenina dinucleótido oxidado (NAD⁺) como cofactor (Brownlee, 2005). Aproximadamente el 3 % de glucosa se metaboliza por la vía de los polioles en condiciones normoglicémicas. Sin embargo, en condiciones hiperglicémicas esta vía metaboliza más del 30 % de la glucosa, hecho que produce una acumulación de sorbitol intracelular que ocasiona un daño al tejido (Cheng *et al.*, 1964).

2.1.1 Aldosa Reductasa (AKR1B1)

La Aldosa Reductasa (AKR1B1, abreviatura para la enzima humana) es un monómero proteínico de 316 residuos de aminoácidos (PM = 36 kDa), la cual pertenece a la superfamilia de las aldose reductasas. Este grupo de enzimas catalizan una variedad de reacciones de oxidación-reducción de grupos carbonilo de una amplia variedad de sustratos tales como aldehídos, cetonas, prostaglandinas, esteroides y xenobióticos (Barski *et al.*, 2009). La AKR1B1 muestra gran eficiencia catalítica con aldehídos no ramificados saturados e insaturados. Cuando la

concentración de glucosa en la célula es grande, la AKR1B1 reduce la glucosa a sorbitol (Alexiou *et al.*, 2009).

Su estructura está compuesta por un motivo α/β barril. Un centro de ocho láminas β paralelas conectadas por ocho hélices α periféricas, es conservado en todas las AKRs. El sitio activo hidrofóbico está formado por residuos aromáticos, residuos no polares, residuos polares y tres posibles donadores de protones (Tyr48, His110 y Cys298). El sitio activo cambia su forma a una variedad de conformaciones de unión que depende del inhibidor al que se una. Las posibles conformaciones indican un remarcado ajuste inducido y flexibilidad del sitio activo. Tres distintas conformaciones de la AKR1B1 en el sitio activo son propuestas de acuerdo con estudios de cristalografía de rayos X. El primero se llama “sitio de unión aniónica” y se conforma por la cabeza aniónica de un ligando. La unión se lleva a cabo sobre los residuos Tyr48, His110, Trp20 y Trp111. El segundo se llama “sitio específico” y es de naturaleza hidrofóbica. Éste se conforma por los residuos Leu300, Cys298, Cys303, Trp111 y Phe122. El tercero se llama “sitio hidrofóbico” y se conforma por los residuos Trp20, Trp111, Phe122 y Trp219 (Zhu, 2013).

La AKR1B1 se expresa en riñón, glóbulos rojos, tejido mieloide, epidídimo, placenta, glándula suprarrenal y ojo (córnea, cristalino y retina) (Tang *et al.*, 2012). En condiciones de homeóstasis, esta enzima tiene las siguientes funciones:

- Desintoxicación celular. Una de las funciones de la AKR1B1 es participar en procesos de desintoxicación en la célula, en la cual reduce aldehídos tóxicos a alcoholes inactivos. La peroxidación de lípidos, glicación y oxidación de aminoácidos son la mayor fuente de aldehídos reactivos *in vivo*. Estos causan interacciones entre proteínas, inactivan enzimas, dañan al ADN, lesionan a la mitocondria y afectan la proliferación celular. Estos eventos conducen a daño en el tejido y contribuyen a varias enfermedades (Alexiou *et al.*, 2009).

- Regulación osmótica. Las células expuestas a estrés osmótico permanente activan mecanismos de adaptación e.g. la inducción de la expresión genética. Ésta se controla a nivel transcripcional, en la cual participa el factor de transcripción TonEBP en el caso de células eucariotas. TonEBP induce el incremento en la expresión de los genes de la AKR1B1 y genes de transportadores de betaína. El aumento en la expresión de AKR1B1 incrementa la cantidad de sorbitol a través de la reducción de la glucosa. (Ben *et al.*, 1997).
- Maduración de espermatozoides. Los espermatozoides para lograr su maduración y adquirir su habilidad fertilizante transitan por el epidídimo. Durante el tránsito por el epitelio epidídimal, el epidídimo secreta epidídimosomas que interactúan con el espermatozoide. Las proteínas del epidídimosoma se incorporan a la superficie del espermatozoide para definir dominios. La AKR1B1 es una de las proteínas mayoritariamente asociadas con el epidídimosoma y su actividad aumenta la formación de fructosa, la cual entra a la vía de la glucólisis y produce la energía necesaria para la movilidad del espermatozoide inmaduro (Saez *et al.*, 2003).

2.1.2 Sorbitol deshidrogenasa (SDH)

La SDH es una enzima tetramérica perteneciente a la familia de las Alcohol deshidrogenasas de cadena media que contiene Zinc, esta distribuida en casi todos los tejidos de mamíferos y su ubicación es dentro del citosol de la célula. Esta enzima cataliza la conversión de sorbitol a fructosa en presencia de NAD^+ y la actividad catalítica es igual entre sus cuatro subunidades. Cada subunidad contiene 356 residuos de aminoácidos con un sitio conservado de unión a un

Zinc, sitio de unión al cofactor y su sitio activo con afinidad a sustratos hidrofóbicos (Kabbani *et al.*, 2004). La enzima presenta mayor afinidad al al nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NADH) que al NAD⁺ a valores de pH altos y bajos así como a un pH de 7.4. El paso limitante de su reacción es la disociación entre la enzima y su coenzima. La función principal de la SDH es transformar el sorbitol a fructosa, por ello su actividad está relacionada con procesos metabólicos en los que está implicada la fructosa. En condiciones de hiperglicemia crónica se genera un incremento en la acción de la AR y no en la SDH, esto causa una acumulación de sorbitol que conduce a daño celular (Brownlee 2001).

2.1.3 Incremento en la incidencia de la vía de los polioles

Los mecanismos que se proponen para explicar el efecto perjudicial del incremento en el flujo de la vía de los polioles inducido por la hiperglucemia crónica son estrés osmótico inducido por sorbitol, decremento de la actividad ATPasa (Na²⁺K⁺), incremento citosólico de NADH/NAD⁺ y decremento citosólico de NADPH⁺ (Brownlee, 2001).

El decremento en la concentración de NADPH⁺. afecta negativamente a otras enzimas que participan en los mecanismos antioxidantes de la célula. Así produce un aumento en el estrés oxidativo. Por otra parte, el aumento de la proporción de NADH/NAD⁺ inhibe la actividad de la enzima Gliceraldehído-3-Fosfato Deshidrogenasa (GAPDH). A consecuencia de esto se produce incremento de productos finales de glicación avanzada (AGEs). (Brownlee, 2001) (Díaz *et al.*, 2004).

La acumulación de sorbitol conduce a un aumento de estrés osmótico en las células debido a su incapacidad para difundir con facilidad al exterior, lo que produce una lisis celular (Srivastava *et al.*, 2005).

2.2 Catarata ocular

El ojo humano está conformado por tres capas: la córnea (la más resistente), la úvea y la retina. Además, en el contenido ocular encontramos al humor acuoso y al humor vítreo, así como al iris y al cristalino. El cristalino está conformado por fibras en forma hexagonal que se encuentran acomodadas en capas parecidas a la piel de una cebolla. Las fibras del cristalino son células maduras que pierden el núcleo y los organelos con la finalidad de mantenerse completamente cristalino. Este órgano se ubica detrás del iris y su cara posterior se encuentra en el humor vítreo. Entre sus características se encuentra que carece de aporte sanguíneo, así como de innervación.

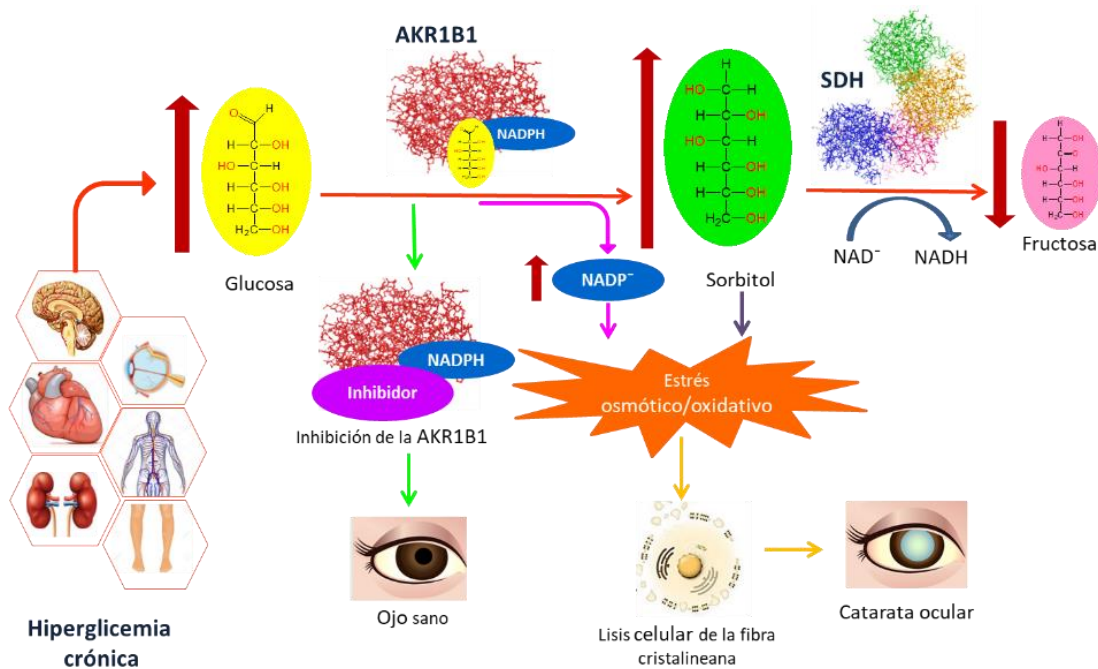


Figura 1.- Polioles en la formación de catarata diabética. AKR1B1: aldosa reductasa, SDH: sorbitol deshidrogenasa. Ante un incremento en la concentración de glucosa, el sorbitol se acumula en la célula, lo que genera una serie de alteraciones que culminan en estrés osmótico y oxidativo.

Con el paso del tiempo este crece en peso y tamaño. El cristalino está constituido por 2/3 de agua y 1/3 de proteínas y su función es enfocar la luz sobre la retina. Este órgano a su vez se divide en

cápsula acelular, epitelio cristalino, células fibrosas de la corteza y zona nuclear interior. El combustible metabólico principal que utiliza es la glucosa. Entre las alteraciones generadas en esta zona se encuentra la formación de catarata (Banditelli *et al.*, 1999).

La catarata ocular es la opacidad del cristalino. Uno de los principales factores que contribuyen a la formación de catarata es la *Diabetes mellitus*, considera una causa líder en la inducción de ceguera en el mundo. La catarata se caracteriza por la pérdida de visión gradual sin dolor. El grado de pérdida de visión depende del tamaño y la localización de la catarata. La cual puede ser en el centro del cristalino (nuclear), en el córtex superficial (cortical) o en el área subcapsular posterior (Kathleen, 2001). La catarata es consecuencia de la alteración de las fibras cristalinianas. El exceso de glucosa que produce la acumulación del sorbitol induce una alteración en el equilibrio osmótico. El estrés osmótico en los cristalinos provoca que las células se hinchen, la permeabilidad de la membrana se altera y esto promueve la alteración de las fibras cristalinianas (Brownlee, 2001).

En 1974 Varma y colaboradores realizaron una de las primeras investigaciones que relacionan a la actividad de la AKR1B1 con la formación de catarata diabética. Ellos concluyeron que la formación de catarata en ratones se causa por el incremento en la actividad de la AKR1B1. Esta hipótesis fue respaldada 21 años después por Lee y colaboradores (1995), quienes observaron que cuando la expresión de AKR1 es mayor, incrementa la acumulación de sorbitol, esto conlleva a la aceleración en la formación de catarata.

El único tratamiento para la catarata ocular es la cirugía. En esta el cristalino se remueve y reemplaza por un cristalino intraocular artificial permanente. Este procedimiento es invasivo y tiene un costo elevado por lo que no todas las personas que padecen de catarata ocular pueden tener acceso a esta opción (Tabin *et al.*, 2008).

El diseño y descubrimiento de inhibidores de la enzima AKR1B1 ofrece un enfoque terapéutico para la prevención de complicaciones de la *Diabetes mellitus* como la catarata.

2.3 Inhibidores de la AKR1B1 (IAR)

El número de fármacos que se sintetizaron para inhibir a la enzima AKR1B1 en modelos experimentales y que alcanzaron un ensayo clínico es pequeño. Dos principales clases de inhibidores de la AKR1B1 se establecieron:

- IARs con grupo carboxilo.- Son la más grande clase de IARs y se caracterizan por tener en su estructura un grupo carboxilo, el cual interacciona con la enzima. El tolrestat, la alrestatina (inhibidor más potente de esta clase hasta ahora), el zopolrestat y el epalrestat son ejemplos de estos inhibidores. El epalrestat es el único que se comercializa y sólo se encuentra disponible en Japón (Alexiou *et al.*, 2009 ; Changjin Zhu, 2013).

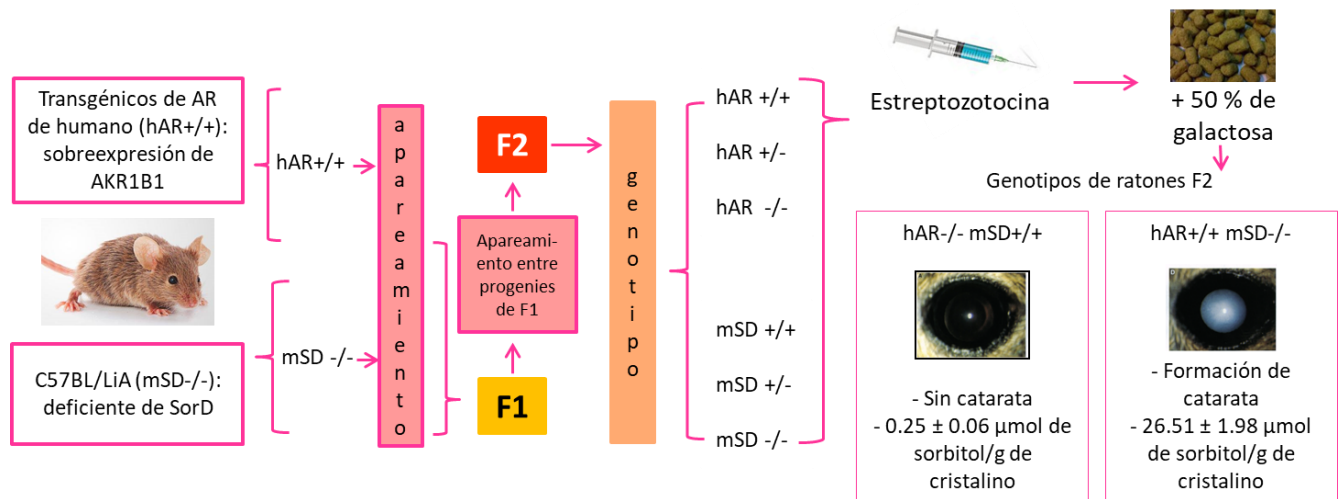


Figura 2.- Evidencia genética de la participación de la vía de los polioles en la formación de catarata diabética. Ratones que no expresan la SDH presenta de forma más temprana la formación de catarata debido a la acumulación de galactitol

- IAR derivados de espirohidantoína.- Se caracterizan por tener un anillo hidantoína responsable de la interacción con la AKR1B1. El sorbinil fue el primer IAR que se sintetizó de este tipo. Éste tuvo buena inhibición a la AKR1B1 *in vitro* e *in vivo*. Su administración a

pacientes con *Diabetes mellitus* ocasionó reacciones de hipersensibilidad, con síntomas como mialgia, fiebre y alteración en la piel (Jaspan *et al.*, 1985).

Además de la búsqueda de inhibidores sintéticos, las plantas se manifiestan como fuentes interesantes para la búsqueda de inhibidores para AKR1B1. Los flavonoides quercetina, quercitrina y miricitrina se reconocen como inhibidores de esta enzima.

2.4 Activadores de la SDH

Durante años se ha planteado la idea de que inhibidores de la SDH ayudarían a preservar el decremento de NADH, Esto coadyuvará a prevenir complicaciones secundarias en la *Diabetes mellitus* como la catarata ocular.

Se ha observado que la actividad de la SDH decrementó en un estado de hiperglucemia. En ratones alimentados con galactosa la catarata ocular ocurre en menos días y es severa. El producto de la galactosa metabolizada por la AR es el galactitol. Este no puede ser metabolizado por la SDH por lo que hay mayor acumulación de galactitol comparado con ratones alimentados con glucosa donde el producto es el sorbitol y este si es metabolizado por la SDH. Con ello podemos desestimar que la inhibición de la SDH ayudaría a la inhibición de la formación de catarata (Kador 1988) sino todo lo contrario, la inhibición de esta enzima promueve la formación de catarata. La propuesta es activar a la enzima SDH para con ello aliviar la acumulación de sorbitol. Compuestos activadores de la SDH ya existen, pero desafortunadamente estos compuestos son teratogénicos por lo que son inapropiados para usarlos como medicamentos en el control de catarata ocular causada por hiperglucemia (Meijers *et al.*, 2001)

2.5 Productos naturales vegetales

Las plantas son organismos sésiles que poseen mecanismos fisiológicos para detectar, procesar y responder a estímulos del entorno. Éstas producen metabolitos secundarios en cada paso del proceso de su desarrollo (germinación, crecimiento, reproducción y defensa). Los metabolitos secundarios actúan como mensajeros químicos, los cuales son la base del establecimiento de mecanismos de defensa y comunicación dentro de las diferentes especies. Estos forman un arsenal fitoquímico que ofrece una oportunidad excelente para el aislamiento, purificación e identificación de compuestos químicos. Los metabolitos secundarios se agrupan según su origen biosintético común: terpenos y esteroides, flavonoides, cromenos y benzofuranos, cumarinas, quinonas, alcaloides entre otras (Jiménez *et al.*, 2003).

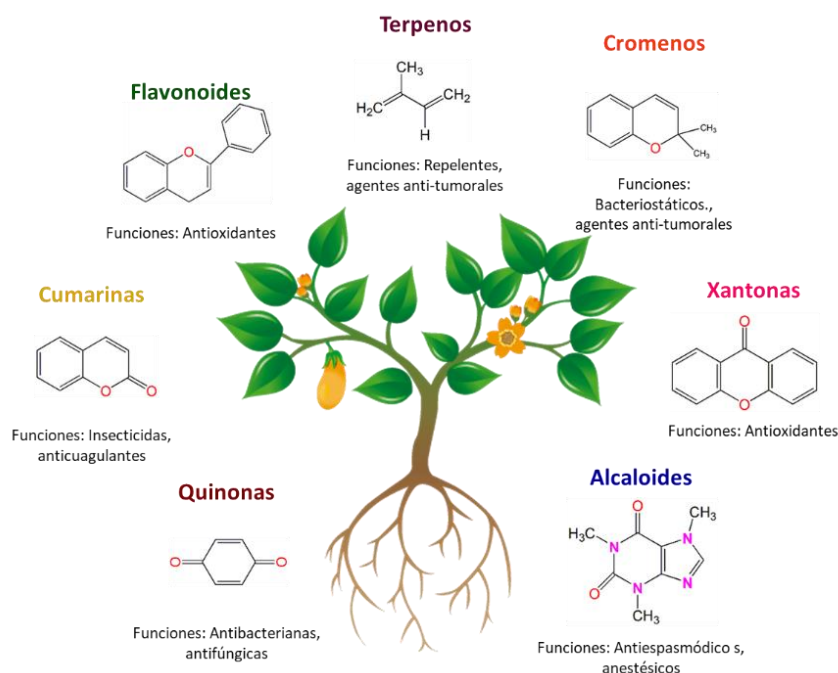


Figura 3.- Metabolitos secundarios producidos por especies vegetales

2.6 Uso de plantas medicinales

Las plantas sirven como un posible tratamiento médico debido a sus compuestos específicos (Heinrich *et al.*, 1998). Propiedades farmacológicas, indicaciones y dosis se establecen hoy en

día para muchas plantas. Estas plantas pasan por una revisión estricta de investigadores, quienes buscan una nueva propiedad farmacológica de los múltiples bioactivos, químicos y componentes de la planta (Morales López *et al.*, 2007).

En un atlas de plantas medicinales se copilaron un total de 3,000 especies empleadas por diversos grupos étnicos (Ramírez-López *et al.*, 2010). Aproximadamente el 1 % se estudió a fondo con respecto a su potencial médico. Las plantas son una valiosa fuente de sustancias biológicamente activas, ya sea en forma de medicamento vegetal o de materia prima para la industria farmacéutica. Temas recurrentes de investigación en el reino vegetal incluyen el aumento en la búsqueda de nuevas moléculas, con efectos específicos farmacológicos no tóxicos y efectivos en control de enfermedades humanas (Ramírez-López *et al.*, 2010).

Michoacán tiene fuertes contrastes entre ambientes diferentes. Estos tienen extraordinaria riqueza genética con variaciones entre especies en los diferentes ecosistemas (García-Sánchez *et al.*, 2011).

Un estudio en la búsqueda de inhibidores para la enzima AKR1B1 con plantas nativas de Michoacán aún no existe. En otros países se investiga la búsqueda de IARs en plantas. Un grupo de flavonoides son algunos de los IARs naturales más potentes. En estudios se muestra que el consumo oral de quercetina conduce a disminución en la acumulación de sorbitol en cristalinos de ratas diabéticas, así como el retraso en la formación de catarata (Goodari *et al.*, 2005). Un estudio en humanos, aunque no en células del cristalino, encontró que la vitamina C oral en dosis de 100-600 mg diarios, fue capaz de normalizar el nivel de sorbitol en glóbulos rojos en un periodo de 30 días en individuos con *Diabetes mellitus* tipo 1 (Vincent *et al.*, 1999). El ácido lipoico (AL) es útil para evitar la formación de catarata, tiene un potente efecto antioxidante. Esta propiedad es la responsable de gran parte de su efecto protector en la catarata diabética (Kathlee, 2001).

2.6.1 Acido 13-*epi*-labdanólico y metilripariocromeno A: Inhibidores de la Aldosa reductasa

En la búsqueda de posibles inhibidores de la AR, un escrutinio de plantas nativas de Michoacán fue realizado. Este estudio dio como resultado que 56 de las 106 especies evaluadas presentaron inhibiciones que van de 8 a 96 % de inhibición. Las plantas que tuvieron inhibición mayor al 70% fueron elegidas para continuar con el estudio bioguiado y obtener el compuesto responsable de dicha inhibición. Con el método de cromatografía en columna usando disolventes en polaridad ascendente se purificaron compuestos. Acetato de Lupeol, mezcla de α and β -amirina, ácido 3-oxo- γ -costico, Encecalina, Lupeol, Metilripariocromeno A, ácido 2-OH eperuico, Derivado de timol 1, derivado de Timol 2, Ácido catívico, desmetilencecalina y mezcla de triterpenos son los que presenta inhibición. El Ácido 13-*epi* labdanólico presentó mayor inhibición de en un ensayo *in vitro*. Este mismo compuesto se evaluó como inhibidor de la formación de catarata en un ensayo *ex vivo* donde cristalinos de conejo se cultivaron en medio y se le administró un exceso de glucosa para inducir a catarata. La observación fue que el Ácido 13-*epi* labdanólico si inhibe la formación de catarata pero a concentraciones altas este causa daño en el cristalino. (Beltrán Sanchez, 2015)

2.7 Ciclodextrinas y su uso en el área farmacéutica

Las ciclodextrinas son oligosacáridos naturales con estructura de macrociclos compuestos por varias unidades de glucosa unidos mediante enlaces α -D-(1-4). Estas tienen una alta solubilidad en agua, pero su cavidad interna es hidrófoba, lo que les da un comportamiento dual en cuestión de hidrofobicidad, además, les da la capacidad de alberga en su interior compuestos hidrófobos y a su vez estar solubles en un medio acuoso con la formación de un complejo de inclusión. Esta gran característica de las ciclodextrinas las ha llevado a ser ampliamente utilizadas en diferentes industrias (Mayur *et al.*, 2012).

El mayor porcentaje de uso de ciclodextrinas es en el área de la alimentación, así como la cosmética y el aseo personal. El campo que más investigación brinda a estos compuestos es el área farmacéutica. Muchos fármacos son insolubles en agua y debido a esto no tienen una absorción óptima, otros fármacos tienden a oxidarse por la luz y algunos otros causan irritación en la piel y/o las mucosas. Todos estos pueden formar un complejo de inclusión con las ciclodextrinas y con ello remediar estas desventajas mencionadas. También se usan para lograr la liberación prolongada de algunos fármacos. Se forman complejos de inclusión entre estos fármacos y las ciclodextrinas y estos son administrados. La disociación de estos complejos es de forma gradual y con ello se logra una liberación prolongada (Loftsson *et al.*, 2002).

JUSTIFICACIÓN

El re-establecimiento del equilibrio metabólico de la vía de los polioles de la fibra cristalina hiperglicémica mediante inhibidores de la Aldosa reductasa (AR) y activadores de la Sorbitol deshidrogenasa (SDH) es un área de oportunidad. Farmacológicamente, esta condición metabólica y complicación secundaria en la diabetes aún no se controlan. Comercialmente no existen activadores de la SDH, así como pocos inhibidores de la AR. Al respecto, en previo escrutinio fitoquímico guiado por la actividad enzimática observamos que algunos fitometabolitos y extractos vegetales inhibieron a la AR pero que causaron daño tisular. Esta observación motiva a re-evaluar mediante complejos de inclusión a base de ciclodextrinas los efectos inhibitorios de la AR y activador de la SDH de los escasos fitometabolitos encontrados y para lograr el éxito es necesario aumentar el número de fitometabolitos

HIPÓTESIS

Complejos de inclusión a base de ciclodextrinas y fitometabolitos inhiben la formación de catarata nuclear experimental *ex vivo* mediante el control de la hiperproducción de sorbitol a través de la inhibición de la AR y/o con la activación de la SDH.

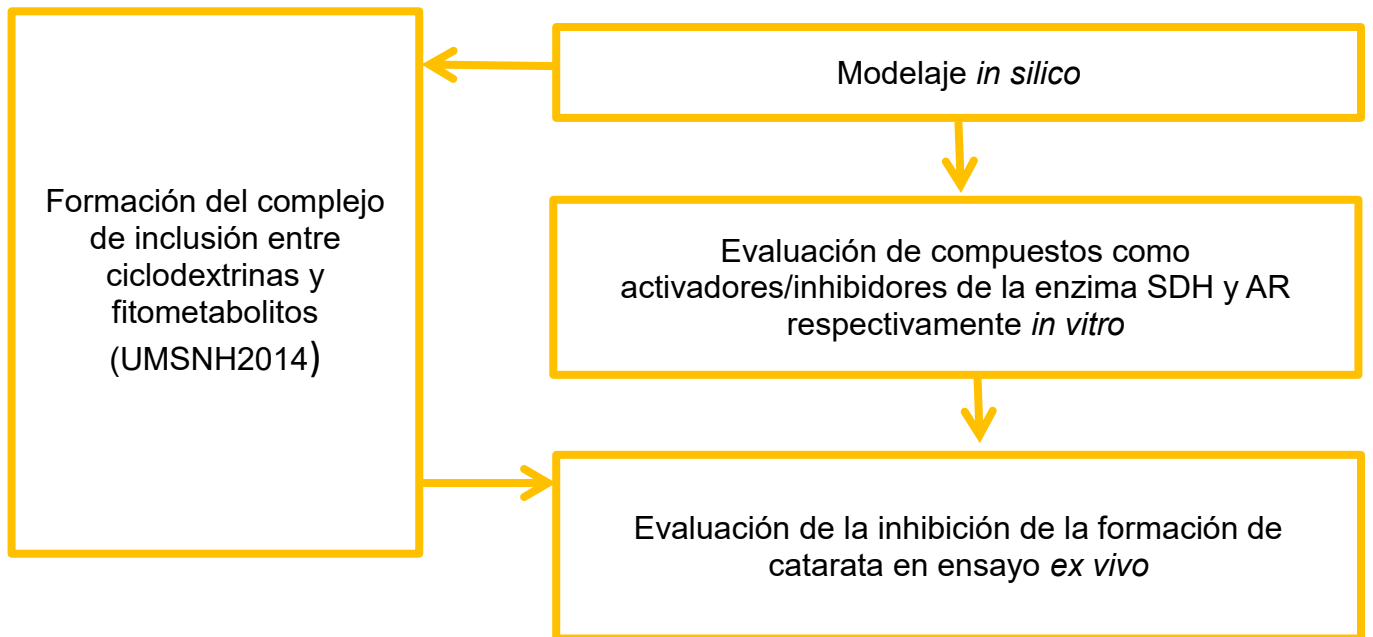
OBJETIVOS

Obtener un complejo de inclusión a base de ciclodextrinas y fitometabolitos que inhiba la formación de la catarata nuclear experimental.

Objetivos particulares

- Diseñar un complejo de inclusión a base de ciclodextrinas y fitometabolitos que reduzca la producción de sorbitol a través de la inhibición de la AR e inhiba la formación de catarata nuclear experimental de forma *ex vivo*.
- Obtener un compuesto activador de la SDH purificado de plantas nativas de Michoacán.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPITULO 1.- Compuestos purificados del género *Eupatorium spp.* y su efecto inhibitor en la Aldosa reductasa

Aldose reductase inhibition by bioactive phytometabolites from *Eupatorium* spp.

Abstract

The progressive accumulation of sorbitol in the crystalline cells of a human with chronic hyperglycemia ends with cell lysis, it known as cataract. In the polyol pathway, the enzyme aldose reductase (AR) produces sorbitol from glucose. Therefore, the aim is to find phytometabolites in native plants that prevent cataract through catalytic inhibition of AR (ARIs). For this, a combined research approach was used. Analyzes were a chemical fractionation bioguide by AR enzyme activity and chromatographic, NMR and bioinformatics technics. The AR was extracted from rabbit lenses. The metabolomes of thirteen plant species of the genus *Eupatorium* were the natural resource that was explored. Some of them are cosmopolitan plants and others have a use in traditional medicine. All of them exhibited an inhibitory effect on AR. With sociocultural criteria, six *Eupatorium* spp were selected to continue with the phytochemical scrutiny. Of these, twelve pure phytometabolites were obtained, which were tested for their inhibitory effect on AR. The EC₅₀ values interval was 7 μM to 100 μM of seven pure phytometabolites. All of them were subject to the accepted heuristic rules for druglikeness. With this analysis a possible active principle emerged, methylripariochromene A, since no violation of the rules exhibited. Whose inhibition of enzyme catalysis is by an apparent catalytic mechanism mixed. Molecular docking and molecular dynamic analyzes helped to understand their coupling in the active site of AR. Which was consistent with the verification results.

Keywords: Aldose reductase, *Eupatorium*, Phytometabolites, Inhibition, Drug-like, Molecular dynamics

1. Introducción

La catarata ocular es una complicación secundaria de la *Diabetes mellitus*. La cual se considera una de las principales causas de ceguera en el mundo [1,2]. Las fibras cristalineas son parte del grupo de células que son incapaces de regular el ingreso de glucosa al citosol mediante la insulina [3, 4]. Por esta razón, la concentración de glucosa intracelular es dependiente de la glucosa extracelular. La glucosa intracelular en exceso altera a la vía de los polioles y se le relaciona con la formación de catarata, así como de otras complicaciones secundarias propias de la diabetes [5]. Esta vía tiene dos reacciones enzimáticas. En la primera reacción la Aldosa reductasa (AR) reduce glucosa a sorbitol con el cofactor NADPH⁺. El sorbitol es oxidado a fructosa en la segunda reacción la cual es catalizada por la Sorbitol deshidrogenasa (SDH) con el cofactor NAD⁻ [6]. En los órganos insulino independientes, el incremento de glucosa en la sangre conlleva al incremento de glucosa dentro de las células. Con esto, la actividad enzimática de la AR incrementa y genera la acumulación de sorbitol intracelular y el decremento de NADPH⁺ [7, 8]. La SDH a diferencia de la AR no incrementa su actividad ya que esta enzima es regulada cuando incrementa la concentración del complejo SDH/NAD⁻/Sorbitol [9]. Estrés osmótico se genera por la acumulación de sorbitol pues este actúa como osmolito orgánico. El decremento de NADPH⁺ afecta la actividad de otras enzimas como la Glutación reductasa y esto genera estrés oxidativo. Tanto el estrés osmótico como el estrés oxidativo generan lisis celular [10, 11]. La no eliminación de las células lisadas y la acumulación de detritus celulares causa la opacidad puntual del cristalino o formación de catarata ocular [12]. La inhibición de la AR es una alternativa para prevenir la acumulación de sorbitol generado por la hiperglucemia y con ello prevenir la formación de catarata ocular [13, 14]. Aunque diversos ARIs han sido propuestos en el campo de la *Diabetes mellitus*. Actualmente no existe ningún fármaco en el mercado que prevenga la formación de

catarata en pacientes con hiperglucemia. Por lo que, la investigación continúa para descubrir agentes más eficaces y selectivos con propiedades farmacocinéticas óptimas.

La búsqueda de compuestos bioactivos comienza con el conocimiento etnomédico y etnobotánico. En este sentido, el inicio es estudiar las especies de plantas colonizadoras exitosas o las utilizadas en la medicina tradicional y las nativas del territorio [15]. Las plantas son organismos productores de una variedad de compuestos químicos. Durante años estos compuestos se han utilizado en el área farmacéutica para tratar afecciones en el hombre o como modelo para la síntesis de nuevas moléculas con actividad farmacológica [16, 17]. Aspectos como la abundancia de la planta, la accesibilidad para recolectarla, su uso medicinal y el rendimiento a la hora de obtener el extracto se deben de tomar en cuenta para considerar a una planta como candidata para la obtención de compuestos [18]. Una búsqueda en herbarios tanto nacional como local y en listados florísticos se encontró que en esta región está presente la *Tribu Eupatorieae* y sus especies vegetales son abundantes distribuidas en varios géneros, entre los que destaca, *Eupatorium* [19-21]. El género *Eupatorium* (tribu Eupatorieae, Familia Asteraceae) tiene alrededor de 1200 especies de plantas [22, 23]. En Michoacán existen cerca de 69 especies de este género. Algunas de los cuales se utilizan en medicina tradicional para remediar alteraciones en la salud por ejemplo uso antibacteriano, antifúngico y analgésico [24-27]. La importancia del género *Eupatorium* es que se le describen alrededor de 1200 especies distribuidas principalmente en América tropical. Algunas *Eupatorium* sp tienen propiedades medicinales que se utilizan para aliviar dolencias de infecciones, algunas son malezas y están asociadas con ecosistemas perturbados [28-31].

El género *Eupatorium* es una fuente prometedora de nuevas moléculas con actividad biológica. En el se han purificado casi dos centenares de compuestos [32]. Si bien, de este género existe

información fitoquímica. Sin embargo, los metabolomas de muchas especies nativas y endémicas son desconocidos e inexplorados en la búsqueda de componentes bioactivos. Hasta ahora, en la región se encontraron 69 especies de *Eupatorium* [33]. Indudablemente que una línea de investigación se genera para la exploración fitoquímica biodirigida. En el presente estudio se propone la exploración fitoquímica mediante una bioguía. Con el propósito de obtener fitometabolitos purificados de algunas especies de *Eupatorium* con capacidad inhibitoria para afectar la catálisis de la enzima Aldosa reductasa del cristalino de conejo.

3. Resultados y Discusión

El estado de hiperglucemia conduce a un incremento en la actividad de la AR. Esto genera la acumulación de sorbitol y produce un desequilibrio osmótico y metabólico que conduce a la muerte celular [34]. La acumulación de este detritus en el cristalino forma la catarata. Por lo que, la inhibición de la AR es una alternativa para prevenir las alteraciones producidas por la hiperglucemia en células que no responden a la insulina. Aunque ya se han encontrado muchos inhibidores contra esta enzima en el campo de la *Diabetes mellitus*, continúa la investigación para descubrir agentes más eficaces y selectivos con propiedades farmacocinéticas óptimas [35, 36]. Una numerosa cantidad de ARIs se han propuesto como candidatos a fármaco, pero ninguno de estos ha llegado a ser comercializado para prevenir la formación de catarata ocular. Diversas especies del género *Eupatorium* crecen en la América tropical. Estas son parte del ecosistema y un valioso recurso natural del que se empieza a conocer su fitoquímica. Además, algunas de ellas son parte de las farmacopeas nativas y este aspecto social y botánico es una oportunidad farmacológica y biotecnológica [37]. En este trabajo se reporta un estudio bioguiado con plantas del género *Eupatorium* para determinar su capacidad para inhibir a la AR de conejo.

Las especies *E. cardyophyllum*, *E. adenophorum*, *E. aerolare*, *E. arsenei*, *E. brevipes*, *E. dolichobasis*, *E. glabratum*, *E. lasioneuron*, *E. mairetianum*, *E. petiolare*, *E. pichinchense* y *E. pycnocephalum* tuvieron mayor porcentaje de inhibición en la actividad enzimática de la AR. Lo cual nos indica que en su composición tiene uno o varios compuestos que inhibe a la AR (tabla 1). De estas especies con mayor inhibición, *E. cardyophyllum*, *E. aerolare*, *E. arsenei*, *E. glabratum*, *E. petiolare* y *E. pycnocephalum* son utilizadas en la medicina tradicional según un estudio de revisión realizado por García-Sánchez *et al.* (2011). Los usos de estas especies son antidiarréicos (*E. aerolare*), antiespasmódico (*E. glabratum*), antidiabético (*E. petiolare*), para aliviar resfriado (*E. pycnocephalum*) y malestar estomacal (*E. arsenei*), por mencionar algunos. Una ventaja de estas especies sobre las no utilizadas en medicina tradicional es su incidencia de toxicidad debido a que estas especies ya han sido consumidas por el hombre y no se ha registrado toxicidad en ellas [33, 38].

Debido a que en el escrutinio obtuvimos una cantidad considerable de extractos con actividad inhibitoria a la AR, para la obtención de compuestos puros se utilizaron criterios cualitativos socioculturales de selección que son importantes para la recolecta, así como para la obtención del extracto. La accesibilidad para recolectar la planta se refiere a la facilidad de acceso a la zona donde se llevó a cabo la recolecta. La accesibilidad la clasificamos como abundante, intermedia o escasa. La Abundancia de espécimen se refiere a la época en la que crece la planta, así como la facilidad con la que se puede cosechar. La evaluación la calificamos como abundante, intermedia o escasa. El rendimiento hace referencia al rendimiento obtenido del extracto. Para este criterio los extractos se separaron en dos grupos, el abundante y el intermedio. El último criterio que se estudio fue el uso de las plantas en medicina tradicional. El resultado de los criterios estudiados fue que seis extractos comparten las siguientes características: accesibilidad de

recolecta y abundancia de espécimen abundante o intermedia, un rendimiento abundante y son utilizadas en medicina tradicional. Por lo que estos extractos fueron elegidos para continuar con el estudio bioguiado.

La purificación de los compuestos se hizo con Cromatografía en columna a través de la separación de acuerdo con su polaridad [39]. Diez compuestos y dos mezclas de triterpenos se lograron purificar de los extractos. Todos se evaluaron como inhibidores de la AR y tuvieron inhibición que van de un 18 a 66%. Plisokas *et al.* (2015) evaluaron la actividad inhibitoria del extracto diclorometánico de *Tephrosia humilis* en el cual se identificó al Lupeol como compuesto mayoritario. El extracto se evaluó a una concentración de 25 mg/ml y el resultado fue 36% de inhibición. Los resultados de este proyecto para el Lupeol son una inhibición de 49% a una concentración de 1mg/ml. La mayor actividad inhibitoria a la AR de este proyecto lo atribuimos a que se evaluó al Lupeol puro y no al extracto de la planta pudiendo tener mayor concentración de este [40].

La concentración inhibitoria media (IC_{50}) es la concentración necesaria para inhibir al 50% la actividad de una enzima. Con este dato se comparó la potencia de inhibición de los compuestos puros. El ensayo se realizó midiendo el porcentaje de inhibición a diferentes concentraciones del inhibidor. Los valores que se obtuvieron van de 7 a 100 μ M. El acetato de lupeol tuvo un IC_{50} de 7 μ M por lo que es el compuesto más potente de este grupo pues necesita menor concentración para inhibir el 50 % la actividad de la AR. El metilpariocromeno A es el segundo con IC_{50} de 8.7 μ M. Después la mezcla de triterpenos 1, el Lupeol y el derivado de ácido eperuico tuvieron IC_{50} de 9.7, 10.3 y 10.3 μ M respectivamente. El Epalrestat el único ARI comercializado indicado en forma farmacéutica oral, tiene un IC_{50} de 0.4 μ M. Si comparamos al Epalrestat con los resultados obtenidos en este proyecto y tomando en cuenta que se trata de un compuesto sintético, los

compuestos purificados de plantas del género *Eupatorium* se posicionan como compuestos alentadores para la inhibición de la AR. [41, 42].

Para predecir de forma *in silico* si un compuesto tiene la posibilidad de comportarse como fármaco existen diversas reglas conocidas como drug-like. Estas reglas evalúan características físico-químicas que permiten conocer el comportamiento farmacocinético de los compuestos [43]. Los doce compuestos puros se sometieron a estas reglas. SwissADME fue la herramienta que se utilizó para realizar el estudio [44]. Regla de Lipinski, Ghose, Veber, Eggan, Muegge y Leadlikeness fueron tomadas en cuenta para este estudio [45-50]. El metilparicromeno A es el único de los compuestos puros que acredita todas las reglas. El 3-oxo- γ -costic acid y la Encalin no aprobaron una de las reglas de Leadlikeness que fue el peso molecular (WM). Esta característica nos permite evaluar si los compuestos pueden atravesar barreras fisiológicas de acuerdo con su tamaño por lo que estos compuestos pudieran tener la dificultada para atravesar las barreras fisiológicas. Derivado de Timol 1 no cumplió con la característica de interacciones rotables (Int. Rotables). Esta característica la tienen la mayoría de los fármacos ya establecidos. La cual debe de ser menor o igual a 7. Desmetilencecalina violó el parámetro de XLOGP de la regla de Leadlikeness. Este dato corresponde al método atomístico para coeficiente de partición octanol/agua. El cual indica la lipofilidad del compuesto y ayuda a predecir su solubilidad en agua. El valor debe de ser menor o igual a cinco. Ácido catívico no aprobó tres de las reglas (Lipinski, Ghose y Muegge). En las tres reglas falló al mismo parámetro que es coeficiente de partición octanol/agua. El resto de los compuestos falló en 5 de las reglas evaluadas y en diversos parámetros en cada una de ellas. Es por ello que elegimos al metilparicromen A para continuar con la investigación ya que aprobó todas las reglas y es uno de los más potentes del grupo por su valor de IC₅₀.

La K_m y V_{max} del extracto crudo de enzima se calcularon para conocer el tipo de inhibición del metilparicromeno A en AR. Diferentes concentraciones del sustrato, con y sin inhibidor se evaluaron. De esto se obtuvo una V_{max} de 2.02 $\mu\text{g/ml/min}$ y un K_m de 5.9 $\mu\text{g/ml}$. Inhibición mixta es el tipo de inhibición que tiene el Metilpariocromeno A. Esto nos indica que el inhibidor no solo se une al sitio activo si no que hay interacción en otro sitio y que esta interacción también inhibe a la enzima.

La constante de inhibición (K_i) es la constante de disociación del complejo enzima-inhibidor. Este dato nos indica que tan fuerte se une el inhibidor a la enzima. A mayor K_i será más débil la unión, y viceversa a menor K_i será más fuerte la interacción enzima-inhibidor. El valor que se obtuvo para la K_i del metilpariocromeno A fue de 5.03 μM (tabla 4). Si comparamos los resultados con los obtenidos para la Alrestatina por Brownlee et al. (2007) [51], quienes obtuvieron una K_i de 2 μM y tomando en cuenta que la Alrestatina es un inhibidor sintético el cual fue diseñado específicamente para interactuar con el sitio activo de la AR, concluimos que el metilpariocromeno A es un compuesto prometedor como inhibidor de la AR

Un Docking molecular se realizó para predecir la forma en la que interactúan el metilpariocromeno A y la AR. El Docking se realizó en el programa Autodock Vina de Schrodinger [52]. El Fidarestat se utilizó como control positivo [53]. El resultado que se obtuvo para el Fidarestat fue una energía de afinidad de -8.7 kcal/mol. La interacción se dio en el sitio activo formando puentes de hidrógeno con TYR48, HIS110, TRP111 y LEU300. Con esto demostramos que nuestra metodología para Docking molecular se acerca a los datos obtenidos por difracción de rayos X indicados en a la base de datos. La menor energía de afinidad del Docking con el metilpariocromeno A fue de -7.3 kcal/mol. Dos puentes de hidrógeno se formaron con TYR48 y CYS298. Los primeros siete sitios de afinidad de unión fueron en el sitio activo. Los cuatro posteriores sitios de afinidad de unión

fueron en otro sitio distinto al sitio activo. La menor energía de afinidad en este sitio fue de -5.9 kcal/mol. Los puentes de hidrógeno que se formaron a esta energía de afinidad fueron con la SER2 y ARG40. Esto se debe al tipo de inhibición mixta que obtuvimos de forma experimental. De tal forma que este sería el segundo sitio de unión donde interacciona el metilpariocromeno A para inhibir a la AR.

Ambos sitios de interacción se les realizó Dinámica molecular. El cálculo se realizó con Desmond durante 10 nanosegundos. Los resultados para el sitio de unión de mayor incidencia fueron una fluctuación de RMSD menor a 2 (0.3 a 1.4 Å) lo cual nos indica que la simulación es estable. El RMSD de la proteína incrementa sobre los 5 y 8 ns indicando un cambio en la conformación de la enzima durante este lapso de la simulación. Los contactos que se formaron son dos puentes de hidrógeno (LYS77 y SER159) y cuatro interacciones hidrofóbicas (TRP20, TRP111, TYR209 e ILE260). De estas interacciones las más persistentes son TYR209 manteniéndose el 99% del tiempo de simulación, además con LYS77, SER159, TRP20, TRP111 manteniéndose entre un 32 y 40%. Los residuos TRP111 y CYS298 forman parte del sitio activo específico lo cual nos ayuda a respaldar los resultados experimentales de inhibición mixta en la cual parte de la inhibición sería competitiva. En la cual el metilpariocromeno A compite con el sustrato para unirse al sitio activo de la AR.

Para la interacción de menor incidencia se observa una fluctuación de RMSD de 0.40 a 1.35 aprox. para el complejo indicando estabilidad en la simulación. El RMSD del ligando incrementa notablemente cerca del primer nanosegundo indicando un cambio en la conformación del Metilpariocromeno A. Los contactos obtenidos son dos puentes de hidrógeno y tres interacciones hidrofóbicas. La interacción con LEU15 se mantiene un 67% del tiempo de la dinámica, la interacción con PHE276 se mantiene el 60% y con PRO13, PHE273 y ARG40 se mantiene el 28,

26 y 8 %, respectivamente. Comparando los resultados de ambos sitios de unión destacamos que el sitio de mayor incidencia presenta interacción el 99% del tiempo de la dinámica, además presenta mayor cantidad de interacciones lo que lo hace más estable.

4. Materiales and Metodos

4.1. Materia vegetal

E. cardyophyllum se colectó cerca del kilómetro 51 de la carretera Morelia-Carapan no. 15. *E. adenophorum*, *E. dolichobasis*, *E. glabratum* y *E. mairetianum*, se colectaron en la carretera Pátzcuaro-Tacámbaro. *E. adenophorum* en las coordenadas N 19° 17.517', W 101° 27.876', 2143 msnm, *E. dolichobasis* en las coordenadas N 19° 29.027', W 101° 35.694', 2357 msnm, *E. glabratum* en las coordenadas N 19° 40.898', W 100° 54.024', 2534 msnm y *E. mairetianum* en las coordenadas N 19° 24.497', W 101° 35.009', 2394 msnm. *E. lasioneuron* se colectó en la carretera Morelia Zacapu, en las coordenadas N 19° 42. 229', W 101° 36.001', 2238 msnm. *E. areolare* y *E. arsenei* se colectaron en la carretera México-Morelia, vía mil cumbres, en las coordenadas N 19° 40.171', W 100° 54.445', 2480 msnm y N 19° 39.414', W 100° 59.719', 2124 msnm, respectivamente. *E. petiolare* se colectó en la Ciudad de Pátzcuaro, Michoacán, en las coordenadas N 19° 30.511', W 101° 35.578', 2243 msnm. *E. pichinchense* y *E. pycnocephalum* se colectaron en la Comunidad de San Juan de Viña. *E. pichinchense* en las coordenadas N 19° 20.817', W 101° 28.915', 2335 msnm y *E. pycnocephalum* en las coordenadas N 19° 20.149', W 101° 28.663', 2268 msnm.

4.2. Obtención de extractos

La obtención de los extractos se realizó por maceración sucesiva con disolventes de polaridad ascendente [39]. En sombra se secaron las plantas por tres semanas a temperatura ambiente. Cada parte de la planta se separó, se trituró, se pesó y almacenó hasta su uso. Para la obtención del extracto, la muestra vegetal se maceró con diferentes disolventes. Para la primera etapa de extracción se maceró con 200 ml de hexano para 11 g de la muestra vegetal por 3 días y se filtró. En un evaporador rotatorio a 55 °C se concentró el extracto. Para la segunda extracción se maceró con 200 ml de cloruro de metilo por 3 días, se filtró y se concentró. La tercera extracción se maceró con 200 ml de metanol y se repitió el mismo procedimiento que para la primera y segunda extracción. Cada extracto se disolvió en DMSO a una concentración de 1 mg/ml. Este se evaluó como posible ARI.

4.3. Purificación de compuestos

La purificación de compuestos se realizó con cromatografía en columna siguiendo la metodología utilizada por García-Sánchez *et al.* (2011). Gel de sílice (200-400 mesh) de la marca MERCK se utilizó como fase estacionaria. Mezclas de hexano y acetato de etilo se utilizaron como fase móvil a proporciones de 2:8, 4:6, 6:4 y 8:2 con un volumen final de 135 ml. Estas se pasaron por la columna iniciando con 135 ml de hexano y siguiendo con el orden de las mezclas en de polaridad ascendente. Fracciones de 15 ml aproximadamente se recolectaron. Estas se evaluaron como posibles ARIs. Las fracciones que tuvieron actividad inhibitoria fueron nuevamente cromatografiadas en columna con mezcla de los mismos disolventes. Los compuestos puros fueron caracterizados con Cromatografía en capa fina (CCF) y Resonancia Magnética Nuclear (RMN) (Varian Mercury plus 400 [38, 39])

4.4. Obtención y actividad de la enzima AR

Extracto crudo de cristalino de conejo se utilizó como fuente enzimática. Los ojos de conejo donados por la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia Unidad Posta Zootécnica se disecaron (NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999) y se les extrajo el cristalino con la ayuda de tijera quirúrgica y bisturí. Estos se colocaron en microtubos con solución 1:1 de amortiguador de fosfatos de potasio 0.1 M (pH 6.8) y 2-mercaptoetanol 1mM y se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

La actividad enzimática se midió siguiendo al método establecido por Hayman y Kinoshita (1965) con modificaciones [54]. Los cristalinos de conejo se homogenizaron con un homogenizador manual en buffer de fosfatos de potasio 0.1 mM (pH 6.8) y mezcla de inhibidores de proteasas de la marca Sigma (P9599). El homogenado se centrifugó a 10 000 rpm durante 15 min. El sobrenadante se separó y se utilizó como fuente enzimática. El extracto crudo se utilizó para medir la concentración de proteína a través del método de Lowry.

La mezcla de reacción contuvo 0.1 M de buffer de fosfatos de potasio (pH 6.8), 5 μ M de mercaptoetanol, extracto crudo de enzima a concentración de 8 mg de proteína/ml, 40 μ M de NADPH y 10 μ M de gliceraldehído a un volumen final de 3 ml. La mezcla de reacción del blanco no contuvo gliceraldehído. El consumo de NADPH se midió por el decremento en la absorbencia a 340 nm por 2 min en un espectrofotómetro UV visible (Cary 50 Bio, Varian). El blanco no contuvo gliceraldehído. El valor obtenido del blanco se restó al valor obtenido de la muestra. La mezcla de reacción se calentó a 80 °C por 5 min y finalizados los 2 minutos de reacción para detener la actividad enzimática.

4.5. Medición del glicerol, producto de la reacción enzimática.

La concentración de producto de la reacción enzimática se midió para obtener los datos de IC₅₀ y cinética enzimática. El glicerol se midió por espectrofotometría UV visible con el kit comercial de Free Glycerol Reagent (Sigma F6428). y siguiendo la metodología establecida por la casa comercial con ciertas modificaciones [55].

En cada pocillo de una microplaca de 96 se agregaron 195 µl de Free Glycerol Reagen. Al primer pocillo se adicionaron 5 µl de agua (blanco interno). Al segundo pocillo se adicionaron 5 µl de solución estándar de glicerol (estándar). Al tercer pocillo se adicionaron 5 µl la muestra que corresponde a la mezcla de reacción después de dos minutos de actividad enzimática y calentada a 80 °C por 5 min. Estos se mantuvieron en movimiento a 200 rpm por 20 min. El valor de absorbancia se midió a 540 nm en espectrofotómetro UV visible. La cantidad de glicerol se midió con la siguiente ecuación:

$$\frac{(A_m - A_b)}{(A_s - A_b)} \times 0.26 \frac{\text{mg}}{\text{ml}} \text{ de glicerol}$$

Donde A_m es la absorbancia de la muestra, A_b es la absorbancia del blanco y A_s es la absorbancia del estándar.

4.6. Actividad inhibitoria

La actividad inhibitoria se obtuvo adicionando extractos, fracciones de los extractos o compuestos puros a la mezcla de reacción a una concentración de 0.1 µg/ml. Una mezcla sin sustrato se utilizó como blanco. El porcentaje de inhibición se calculó tomando como 0% de inhibición a la actividad enzimática sin el inhibidor.

4.7. Concentración Inhibitoria 50

La Concentración Inhibitoria 50 (IC_{50}) se calculó con el gráfico de la inhibición de la AR. Para ello se graficó el logaritmo de la concentración del inhibidor contra el porcentaje de inhibición. El valor se obtuvo con la ecuación obtenida de la regresión lineal del gráfico.

4.8. Cinética enzimática

Los parámetros de cinética enzimática se obtuvieron midiendo la actividad enzimática a diferentes concentraciones de sustrato y metilpariocrómico A. La actividad enzimática se midió en las siguientes condiciones. La mezcla de reacción contenía 0.1 M de buffer de fosfatos de potasio (pH 6.8), 5 μ M de mercaptoetanol, extracto crudo de enzima a concentración de 8 mg de proteína/ml, 40 μ M de NADPH, gliceraldehído a diferentes concentraciones que van de 0.1 a 0.01 M y metilpariocrómico A a 3.5, 7.5 o 35 μ g/ml. El consumo de NADPH y la concentración de glicerol se midieron en espectrofotómetros UV visible a 340 y 540 nm, respectivamente. K_m y V_{max} se determinaron con las diferentes concentraciones de gliceraldehído en ausencia y presencia de Metilpariocrómico A en un gráfico de Lineweaver-Burck de doble recíproco.

La constante de inhibición (K_i) se obtuvo de la línea de intersección del gráfico de Lineweaver-Burck contra la concentración del inhibidor.

4.9. Diagrama de Venn

El diagrama de Venn se realizó con los paquetes “gplots” y “VennDiagram” del software R (<https://www.r-project.org/>) [56].

4.10. Parámetros farmacocinéticos (Drug-likeness)

La predicción de drug-likeness se realizó en la plataforma de libre acceso SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>) que incluye las reglas de: Lipinski, Veber, Egan, Muegge, Brenk and Leadlikeness [44].

4.11. Docking molecular

Docking molecular flexible se realizó en el programa Autodock Vina [52]. La estructura 3D de la enzima se obtuvo del PDB (www.rcsb.org) con el código 1PWM. A esta estructura se le eliminó el ligando y las moléculas de agua, se le aplicaron cargas y se minimizó su energía. El metilpariocromeno A se dibujó en el programa Maestro Elements [57]. Esta estructura se optimizó con el nivel de teoría 3LYP16-3111+6(d,p) usando el software Gaussian [58]. Los resultados se visualizaron en el programa Discovery Studio [59].

4.12. Dinámica molecular

La dinámica molecular se realizó en el programa Desmond [60] con las dos configuraciones de menor energía que se obtuvieron del Docking molecular.

El cálculo se realizó con un campo de fuerza OPLS2005. Este se solató en un cuadro orthorhombic de moléculas de agua de Single Point Charge (SPC) con una distancia de 10 Å y la concentración de sales fue de 0.15 M. Para modelar el sistema se utilizó un ensamble NPT a un tiempo de simulación de 10 ns y trayectoria de 10 ps a temperatura de 300 K y presión de 1.01325 psi. Se utilizó el termostato Nosel-Hoover con un tiempo de relajación de 1 ps así como el baróstato isotrópico Martyna-Tobias-Klein con un tiempo de relajación de 2 ps. Cutoff como short range method se utilizó con un radio de 10 Å.

4.13. Datos estadísticos

Todos los experimentos biológicos se hicieron tres veces de forma independiente, por triplicado cada uno de ellos. El programa Statistic 7.0 se utilizó para calcular el promedio de los datos y la desviación estándar.

5. Conclusiones

En un estudio bioguiado de inhibición a la AR con compuestos purificados de plantas del género *Eupatorium*, el Metilpariocromeno A fue el único que aprobó las reglas holísticas para el drug-likeness, además fue uno de los inhibidores más potentes con IC_{50} de 8.7 μ M, con una inhibición tipo mixta la cual fue respaldada con los datos obtenidos de Docking y Dinámica molecular. Esto posiciona al metilpariocromano A como un compuesto prometedor inhibidor de la Aldosa reductasa que prevenga la formación de catarata ocular en la *Diabetes mellitus*.

6- Referencias

- 1.- Peterson, S.R.; Silva, P.A.; Murtha, T.J.; Sun, J.K. Cataract Surgery in Patients with Diabetes: Management Strategies. *Semin Ophthalmol* 2017, 1-8. DOI: 10.1080/08820538.2017.1353817.
- 2.- Chylack, L.T.; JR; M.D; Cheng, H.M.; O.D; Ph.D. Sugar Metabolism in the Crystalline Lens. *Surv Ophthalmol* 1978, 23, 26-34. DOI: 10.1016/0039-6257(78)90195-9.
- 3.- Kador P.F.; Wyman M.; Oates P.J. Aldose Reductase, Ocular Diabetic Complications and the Development of Topical Kinostat®. *Prog Retin Eye Res* 2016, 54, 1–29. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2016.04.006
- 4.- Kiziltoprak, H.; Tekin, K.; Inanc, M.; Goker, Y.S. Cataract in Diabetes Mellitus. *World J Diabetes* 2019, 10(3), 140–153. DOI: 10.4239/wjd.v10.i3.140.
- 5.- Obrosova, I.G.; Chung, S.S.M.; Kador, P.F. Diabetic Cataracts: Mechanisms and Management. *Diabetes Metab Res Rev* 2010, 26, 172–180. DOI: 10.1002/dmrr.1075.

- 6.- Oates, P.J. Polyol Pathway and Diabetic Peripheral Neuropathy. *Int Rev Neurobiol* 2002, 50, 325-392. DOI: 10.1016/S0074-7742(02)50082-9.
- 7.- Alam, F.; Shafique, Z.; Tayyeba, A.S.; Hassham H.B.A.M.; Enzymes inhibitors from natural sources with antidiabetic activity: A review. *Phytotherapy Research* 2018, 1-14. DOI: 10.1002/ptr.6211.
- 8.- Chung, S.M.S.; Ho, C.M.E.; Lam, S.L.K.; Chubg, K.S. Contribution of Polyol Pathway to Diabetes-Induced Oxidative Stress. *J Am Soc Nephrol* 2003, 14, S233–S236. DOI: 10.1097/01.ASN.0000077408.15865.06.
- 9.- Pauly, A.T.; Ekstrom, L.J.; Beebe, A.D.; Chrnyk, B.; Cunningham, D.; Griffor, M.; Kamath, A.; Lee, S.E.; Madura, R.; Mcguire, D.; Subashi, T.; Wasilko, D.; Watts, P.; Mylari, B.L.; Oates, P.J.; Adams, P.D.; Rath, V.L. X-Ray Crystallographic and Kinetic Studies of Human Sorbitol Dehydrogenase. *Structure* 2003, 11, 1071–1085. DOI 10.1016/S0969-2126(03)00167-9.
- 10.- Teodoro, J.S.; Nunes, S.; Rolo, A.P.; Reis, F.; Palmeira, C.M. Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction and Inflammation to Hinder the Progression of Vascular Complications of Diabetes. *Front. Physiol* 2019, 9, 1857. DOI: 10.3389/fphys.2018.01857.
- 11.- Galvez, A.S.; Ulloa, J.A.; Chiong, M.; Criollo, A.; Eisner, V.; Barros, L.F.; Lavandero, S. Aldose Reductase Induced by Hyperosmotic Stress Mediates Cardiomyocyte Apoptosis. *J Biol Chem* 2003, 278, 38484–38494. DOI 10.1074/jbc.M211824200
- 12.- Kinoshita J.H. Mechanisms initiating cataract formation. Proctor Lecture. *Invest Ophthalmol* . 1974. 13(10), 713-24.
- 13.- Comakli, V.; Adem, S.; Oztekin, A.; Demirdag, R. Screening inhibitory effects of selected flavonoids on human recombinant aldose reductase enzyme: in vitro and in silico study. *Arch Physiol Biochem* 2020. 5, 234-247. DOI: 10.1080/13813455.2020.1771377.

- 14.- Quattrini, L.; La Motta, C. Aldose reductase inhibitors: 2013-present. *Expert Opin Ther Pat* 2019. DOI: 10.1080/13543776.2019.1582646.
- 15.- Kousaxidis, A.; Petrou, A.; Lavrentaki, V.; Fesatidou, M.; Nicolaou, I.; Geronikaki, A. Aldose Reductase and Protein Tyrosine Phosphatase 1B Inhibitors as a Promising Therapeutic Approach for Diabetes mellitus. *Eur J Med Chem* 2020, 207, 112742. DOI: 10.1016/j.ejmech.2020.112742.
- 16.- Vaishnav, P.; Demain, L.A.; Unexpected applications of secondary metabolites. *Biotechnol Adv* 2010, 29, 223–229. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2010.11.006.
- 17.- Veeresham, C.; Rama R.A.; Asres, K. Aldose Reductase Inhibitors of Plant Origin. *Phytother. Res.* 2014, 28, 317–333. DOI: 10.1002/ptr.5000.
- 18.- Salehi, B.; Ata, A.; Anil, K.N.V.; Sharopov, F.;Ramírez, A.K.; Ruiz, O.A.; Abdulmajid, S.A.; Valere, P.T.F.; Kobarfard, F.; Amiruddin, Z.Z.; Iriti, Y.T.; Martorell, M.; Sureda, A.; Setzer, W.N.; Durazzo, A.; Lucarini, M.; Santini, A.; Capasso, R.; Adrian O.E.; Atta -ur-Rahman.; Iqbal C.M.; Ch, M.C.; Sharifi-Rad, J. Antidiabetic Potential of Medicinal Plants and Their Active Components. *Biomolecules* 2019, 9, 551. DOI:10.3390/biom9100551.
- 19.- Ramírez, L.C.B.; García, S.E.; León, H.A.; Raya, G.D.; del Rio, R.E.; Flores, G.A.; Martínez, P.M.M. Phytochemical perspective of *Eupatorium* spp. *Pharmacologyonline* 2010, 3, 682-690.
- 20.- García-Sánchez, E.; Ramirez, L.C.B.; Talavera-Alemán, A.; León-Hernández, A.; Martínez, M.R.E.; Martínez, P.M.M.; Gómez-Hurtado, M.A.; Cerda-García-Rojas, C.M.; Joseph-Nathan, P.; del Rio, R.E. Absolute Configuration of (13R)- and (13S)-Labdane Diterpenes Coexisting in *Ageratina jocosotepecana*. *J. Nat. Prod.* 2014, 77, 1005-1012. DOI: 10.1021/np500022w.
- 22.- Liua, P.; Liua, D.; Wei-Huan L.; Zhaoa, T.; Sauriolc, F.; Gua, Y.; Shi*a, Q.; Zhang, M. Chemical Constituents of Plants from the Genus *Eupatorium* (1904–2014). *Chem Biodivers* 2015, 12, 1481-1515. DOI:10.1002/cbdv.201400227

- 23.- Sharma, O.P.; Dawra, R.K.; Kurade, N.P.; Sharma, P.D. A Review of the Toxicosis and Biological Properties of the Genus *Eupatorium*, *Nat. Toxins* 1998, 6, 1-14. DOI: 10.1002/(sici)1522-7189(199802)6:1<1::aid-nt3>3.0.co;2-e
- 24.- Kurade, N.P.; Jaitak, V.; Kaul, V.K.; Sharma, O.P. Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oils of *Lantana camara*, *Ageratum houstonianum* and *Eupatorium adenophorum*. *Pharm Biol* 2010, 48(5), 539–544. DOI: 10.3109/13880200903193336.
- 25.- Habtemariam, S.; Macpherson, A.M. Cytotoxicity and Antibacterial Activity of Ethanol Extract from Leaves of a Herbal Drug, Boneset (*Eupatorium perfoliatum*). *Phytother. Res.* 2000, 14, 575–577. DOI: 10.1002/1099-1573(200011)14:7<575::aid-ptr652>3.0.co;2-1.
- 26.- Kundu, A.; Saha, S.; Walia, S.; Shakil, N.A.; Kumar, J.; Annapurna, K. Cadinene Sesquiterpenes from *Eupatorium adenophorum* and their Antifungal Activity. *J Environ Sci Health C Toxicol Carcinog* 2013, 48:6, 516-522. DOI: 10.1080/03601234.2013.761921.
- 27.- Min˜oa, J.; Muschietti, L.; Ferrarob, G.; Martinob, V.; Acevedo, C. Antinociceptive Activity of *Eupatorium buniifolium* Aqueous Extract. *Fitoterapia* 2005, 76, 100–103. DOI:10.1016/j.fitote.2004.10.009.
- 28.- Rzedowski, J.; Calderón, G.; Tribu Eupatorieae. En *Flora fanerogámica del Valle de México*, 2nd ed., Instituto de Ecología A. C. Centro Regional del Bajío, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, 2005, México, pp. 781-800.
- 29.- Guilherme, S.M.J.; Gracias, B.Z.M.; Helena, A.A.E.; Helio, L.S.M.; Iran, R.L.A.; Domingos, J. Essential Oils Composition of *Eupatorium* Species Growing Wild in the Amazon. *Biochem. Syst. Ecol.* 2002. 30, 1071-1077.
- 30.- Katinas, L.; Gutierrez, D.G.; Grossi, M.A.; Crisci, J.V. Panorama de la Familia Asteraceae (= Compositae) en la República Argentina. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 2007, 42, 113-129.

- 31.- Navarro, G.V.M.; González, A.; Fuentes, M.; Avilés, M.; Ríos, M.Y.; Zepeda, G.; Rojas, M.G. Antifungal Activities of Nine Traditional Mexican medicinal plants. *J. Ethnopharmacol* 2003, 87, 85-88. DOI: 10.1016/s0378-8741(03)00114-4
- 32.- Zhang, M.L.; Wu, M.; Zhang, J.J.; Irwin, D.; Gu, Y.C.; Shi, Q.W. Chemical Constituents of Plants from the Genus *Eupatorium*. *Chem Biodivers* 2008, 1-8. DOI:10.1080/13813455.2020.1771377
- 33.- García-Sánchez, E.; Ramírez, L.C.B.; del Rio, R.E.; Martínez, P.M.M. A revision of *Eupatorium* (Compositae: Eupatorieae) from Michoacán. *Phyton Argentina* 2011, 80, 139-146. DOI:10.32604/phyton.2011.80.139.
- 34.- Ren, Y.; Lu, H.; Reinach, P.S.; Zheng, Q.; Li, J.; Tan, Q.; Zhu, H.; Chen, W. Hyperosmolarity-induced AQP5 Upregulation Promotes Inflammation and Cell Death Via JNK1/2 Activation in Human Corneal Epithelial Cells. *Sci Rep* 2017, 7, 4727. DOI:10.1038/s41598-017-05145-y.
- 35.- Grewal¹, S.; Bhardwaj, S.; Pandita, D.; Lather, V.; Singh S.B. Updates on Aldose Reductase Inhibitors for Management of Diabetic Complications and Non-diabetic Diseases, *Mini Rev Med Chem* 2016, 16, 120-162. DOI: 10.2174/1389557515666150909143737.
- 36.- Alam, F.; Shafique, Z.; Tayyeba, S.A.; Hassham, H.B.A.M. Enzymes Inhibitors from Natural Sources with Antidiabetic Activity: A review. *Phytother Res* 2019, 33, 41–54. DOI: 10.1002/ptr.6211.
- 37.- Flores, F.J.M.; Padilla, C.E.; Fernández, F.O.; Diaz, M.N.E.; Barragán, A.C.P.; Ramírez, R.P.B. Gastroprotective Activity and Pharmacological Safety Evaluation of *Eupatorium aschenbornianum*. *Exp Ther Med* 2019, 18, 4467-4472. DOI: 10.3892/etm.2019.8093.
- 38.- Ramírez, L.C.B.; García-Sánchez, E.; León-Hernández, A.; Raya, G.D.; del Río, R.E.; Flores, G.A.; Martínez P.M.M. Phytochemical Perspective of *Eupatorium* spp. *Pharmacologyonline* 2010, 3, 682-690.

- 39.- Damián, B.L.M.; Espinosa, M.R.M.; Martínez, M.R.E.; Ron, E.O.A.; Salgado, G.R.; Albert, o Flores G.A.; Raya, G.D.; Martínez, P.M.M. The Mexican Medicinal Plants with Antifungal Properties are an Economic and Health Opportunity Area. *Pharmacologyonline* 2008, 3, 61-77.
- 40.- Plioukasa, M.; Gabrielia, C.; Lazaria, D.; Kokkaloua, E. Phytochemical Analysis with the Antioxidant and Aldose Reductase Inhibitory Capacities of *Tephrosia humilis* Aerial Parts' Extracts. *Nat Prod Res* 2015. DOI: 10.1080/14786419.2015.1057729.
- 41.- Kanchan, D.M.; Kale, S.S.; Somani, G.S.; Kaikini, A.A.; Sathaye, S. Thymol, a Monoterpene, Inhibits Aldose Reductase Andhigh-glucose-induced Cataract on Isolated Goat Lens. *J Pharm Bioall Sci* 2016, 8, 277-83. DOI: 10.4103/0975-7406.199348.
- 42.- He, J.; Gao, H.; Yang, N.; Zhu, X.; Sun, R.; Xie¹, Y.; Zeng, C.; Zhang, J.; Wang, J.; Ding, F.; Aa, J.; Wang, G. The Aldose Reductase Inhibitor Epalrestat Exerts Nephritic Protection on Diabetic Nephropathy in db/db Mice Through Metabolic Modulation. *Acta Pharmacol Sin* 2019, 40, 86–97. DOI:10.1038/s41401-018-0043-5.
- 43.- Reddy, T.N.; Ravinder, M.; Bagul, P.; Ravikanti, K.; Bagul, Ch.; Nanubolu, J.B.; Srinivas, J.; Banerjee, S.K.; Rao, V.J. Synthesis and Biological Evaluation of New Epalrestat Analogues as Aldose Reductase Inhibitors (ARIs). *Eur J Med Chem* 2014, 71, 53-66. DOI: 10.1016/j.ejmech.2013.10.043.
- 44.- Oprea, T.I.; Kumar, A.T.; Fara, D.C.; Rad, R.F.; Ostopovici, L.; Bologna, C.G. Lead-like, Drug-like or “Pub-like”: How different are they? *J Comput Aided Mol Des.* 2007, 21(1-3), 113–119. DOI:10.1007/s10822-007-9105-3.
- 45.- Daina, A.; Michielin, O.; Zoete, V. SwissADME: a Free Web Tool to Evaluate Pharmacokinetics, Druglikeness and Medicinal Chemistry Friendliness of Small Molecules. *Sci Rep* 2017, 7, 42717. DOI: 10.1038/srep42717. URL: <http://www.swissadme.ch/>.

- 46.- Lipinski, C.A.; Lombardo, F.; Dominy, B.W.; Feeney, P.J. Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. *Adv Drug Deliv Rev* 2001, 46, 3–26. DOI: 10.1016/s0169-409x(00)00129-0.
- 47.- Ghose, A.K.; Viswanadhan, V.N.; Wendoloski, J.J. A Knowledge-Based Approach in Designing Combinatorial or Medicinal Chemistry Libraries for Drug Discovery. 1. A Qualitative and Quantitative Characterization of Known Drug Databases. *J. Comb. Chem.* 1999, 1, 55-68. DOI:10.1021/cc9800071.
- 48.- Veber, D.F.; Johnson, S.R.; Cheng, H.Y.; Smith, B.R.; Ward, K.W.; Kopple, D.K. Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. *J. Med. Chem.* 2002, 45, 2615-2623. DOI: 10.1021/jm020017n.
- 49.- Egan, W.J.; Merz, Jr.K.M.; Baldwin, J.J. Prediction of Drug Absorption Using Multivariate Statistics. *J. Med. Chem.* 2000, 43, 3867-3877. DOI: 10.1021/jm000292e.
- 50.- Muegge, I. Selection Criteria for Drug-Like Compounds. *Med Res Rev* 2003, 23:3, 302-321. DOI 10.1002/med.10041.
- 51.- Teague, S.J.; Davis, A.M.; Leeson, P.D.; Oprea, T. The Design of Leadlike Combinatorial Libraries. *Angew. Chem. Int. Ed.* 1999, 38:24, 3743-3748. DOI: 10.1002/(SICI)1521-3773(19991216)38:24<3743::AID-ANIE3743>3.0.CO;2-U.
- 52.- Kilpatrick; Bolli. The Effect of Glucose Variability on the Risk of Microvascular Complications in Type 1 Diabetes. *Diabetes Care* 2006, 30, 186-187. DOI: 10.2337/dc06-2073x
- 53.- Trott, O.; Olson, A. J. AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking With a New Scoring Function, Efficient Optimization and Multithreading. *J Comput Chem* 2010, 31, 455-461. URL: <http://vina.scripps.edu/>.
- 54.- El-Kabbani, O.; Darmanin, C.; Schneider, T.S; Hazemann, I.; Ruiz, F.; Oka, M.; Joachimiak, A.; Schulze-Briese, C.; Tomizaki, T.; Mitschler, A.; Podjarny, A. Ultrahigh Resolution Drug Design.

II. Atomic Resolution Structures of Human Aldose Reductase Holoenzyme Complexed with Fidarestat and Minalrestat: Implications for the Binding of Cyclic Imide Inhibitors. *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics* 2004, 55, 805–813. DOI: 10.1002/prot.20001.

55.- Hayman, S.; Kinoshita, J.H. Isolation and Properties of Lens Aldose Reductase and of Lens Aldose Reductase. *J. Biol. Chem.* 1965, 240, 877–882.

56.- Del Corso, A.; Constantino, L.; Rastelli, G.; Buono, F.; Mura, U. Aldose Reductase does Catalyse the Reduction of Glyceraldehyde Through a Stoichiometric Oxidation of NADPH. *Exp. Eye Res.* 2000, 71, 515-521. DOI: 10.1006/exer.2000.0906.

57.- R Core Team (2018). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL: <https://www.r-project.org/>.

58.- Schrödinger Release 2020-3: Maestro, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2020. URL: <https://www.schrodinger.com/maestro>.

59.- GaussView, Version 6.1, Roy Dennington, Todd A. Keith, and John M. Millam, Semichem Inc., Shawnee Mission, KS, 2016.

60.- Dassault Systèmes BIOVIA, Discovery Studio Modeling Environment, Release 2017, San Diego: Dassault Systèmes, 2016. URL: <https://discover.3ds.com/>.

61.- Bowers, K.J.; Chow, E.; Xu, H.; Dror, R.O.; Eastwood, M.P.; Gregersen, B.A.; Klepeis, J.L.; Kolossvary, I.; Moraes, M.A.; Sacerdoti, F.D.; Salmon, J.K.; Shan, Y.; and Shaw, D.E. "Scalable Algorithms for Molecular Dynamics Simulations on Commodity Clusters," *Proceedings of the ACM/IEEE Conference on Supercomputing (SC06)*, Tampa, Florida, 2006, November 11-17. DOI: 10.12691/ajmo-4-3-2.

ESCRITO DE DIVULGACIÓN

¡OJO con los polvos blancos culinarios!

Escrito por Rita Beltrán Sánchez y Mauro M. Martínez Pacheco



De niña en las pláticas de sobremesa o participando en las labores de la cocina, tanto mi abuelita como mi mamá repetían una advertencia que en esa época no entendí. Su entendimiento lo logré siendo una adulta. Tal advertencia es, ¡cuidado con la ingesta de los polvos blancos, porque te dañan! Ellas se referían a esos polvos blancos que se usan en la cocina durante la elaboración de alimentos. Efectivamente, hoy en día, con el sedentarismo y el moderno estilo de vida, a los polvos blancos tales como la sal de mesa, la relación con hipertensión, a la harina con la obesidad o al azúcar de mesa con la hiperglicemia, todos relacionados directamente con la diabetes *mellitus*.

En la misma cotidianidad, nos enteramos que algún ser querido o un conocido con diabetes está perdiendo la vista debido a la catarata ocular. El trastorno de la catarata aparece cuando las proteínas del cristalino comienzan a romperse y se acumulan ocasionando que este se nuble. Este es un síntoma secundario de quién padece diabetes, de ahí nuestra frase ¡Ojo con los polvos blancos culinarios!

Esta terrible realidad se llega a convertir en un hecho que trastoca la calidad de vida de quien la sufre y de quienes lo rodean y acompañan. Hoy en día, el único tratamiento que existe para la catarata es el reemplazo del cristalino por uno artificial, con la inclusión de una prótesis mediante cirugía; sin embargo, para no padecerla,



Saber Más: Revista de Divulgación
Año 9
Revista con Arbitraje y Comité Editorial
Registro ISSN: 2007-7041

Morelia, Michoacán a 02 de noviembre de 2020

A QUIEN CORRESPONDA

Por este medio se extiende la CONSTANCIA DE PUBLICACIÓN del ARTÍCULO DE DIVULGACIÓN CIENTÍFICA titulado:

“¡CUIDO con los polvos blancos culinarios!”

Siendo autores Rita Beltrán Sánchez y Mauro M. Martínez Pacheco, a quienes se les conservan y respetan sus derechos intelectuales de autor y son responsables del contenido del artículo publicado en el Número 53 (Año 9:26-29) de la revista de divulgación SABER MÁS, con fecha de publicación del 1º. de noviembre de 2020 (Registro ISSN: 20077041).

La Revista de divulgación Saber Más de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo se distribuye en forma electrónica en formato web, iOS y Android, en una periodicidad bimestral y no tiene fines de lucro.

Se extiende la presente CONSTANCIA para los fines legales que convengan a los autores correspondientes.


Dr. Horacio Cano Camacho
Editor

REVISTA DE DIVULGACIÓN **Saber Más**, ES UNA REVISTA SIN FINES DE LUCRO. LAS EXPRESIONES SON RESPONSABILIDAD DE LOS AUTORES. COMITÉ EDITORIAL: DR. RAFAEL SALGADO GARCIGLIA (DIRECTOR), DR. HORACIO CANO CAMACHO (EDITOR), DR. MARCO ANTONIO LANDAVAZO ARIAS, DR. CEDERIK LEÓN DE LEÓN ACLIÑA, DRA. EK DEL VAL DE GORTARI, M.C. ANA CLAUDIA NEPOTE GONZÁLEZ, DR. LUIS MANUEL VILLASEÑOR CENDEJAS Y DR. JUAN CARLOS ARTEAGA VELÁZQUEZ.

UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

Edificio C2 * Ciudad Universitaria * C.P. 58030 * Morelia, Michoacán * www.sabermas.umich.mx
sabermasumich@gmail.com * Tel. (443) 322 3500

Fwd: Revista de Estructura y Dinámica Biomolecular - Decisión sobre la identificación del manuscrito TBSD-2023-4669. R2

----- Mensaje reenviado -----

De: **Journal of Biomolecular Structure & Dynamics** <onbehalf@manuscriptcentral.com>

Date: mar., 9 de abril de 2024 3:23

Asunto: Journal of Biomolecular Structure & Dynamics - Decision on Manuscript ID TBSD-2023-4669. R2

Hasta: <mauro.martinez.pacheco@umich.Mx>

09-Abr-2024

Estimado Dr. Mauro Pacheco,

Ref: Inhibición de la aldosa reductasa por bioactivo fenólico de Eupatorium spp.

Nuestros árbitros han considerado su artículo y han recomendado su publicación en Journal of Biomolecular Structure & Dynamics. Nos complace aceptar su artículo en su forma actual, que ahora se enviará a la editorial para su edición y composición tipográfica. Los comentarios de los árbitros se incluyen en la parte inferior de esta carta, junto con los del editor que coordinó la revisión de su artículo.

En cuestión de semanas, su artículo se publicará en línea antes de imprimirse como un "último artículo", que se puede citar utilizando el DOI.

Recibirá pruebas para su comprobación e instrucciones para la transferencia de derechos de autor a su debido tiempo.

El editor también solicita que las pruebas se comprueben a través del sistema de seguimiento del editor y se devuelvan dentro de las 48 horas posteriores a la recepción.

Si tiene alguna pregunta sobre el estado de su manuscrito, póngase en contacto con la Oficina Editorial de la Revista (TBSD-peerreview@journals.tandf.co.uk).

Gracias por su contribución a Journal of Biomolecular Structure & Dynamics y esperamos recibir más contribuciones tuyas.

Atentamente,
Profesor Sarma
Editor en Jefe, Revista de Estructura y Dinámica
Biomolecular rhs07@albany.edu

CAPITULO 2.- Formación, caracterización y actividad inhibitoria a la AKR1 del complejo de inclusión β -Ciclodextrina/Metilripariocromeno A

Formación, caracterización y actividad inhibitoria de la AKR1 del complejo de inclusión β -Ciclodextrina/Metilripariocromeno A

Resumen

La formación de catarata es causada por diversos factores. La *Diabetes mellitus* es uno de ellos en donde una alimentación no controlada genera un estado de hiperglicemia. El exceso de glucosa es transformado a sorbitol. Esto genera una acumulación en la concentración intracelular de sorbitol que culmina en opacidad del cristalino y genera la catarata. La AR es la responsable de transformar a la glucosa a sorbitol. El uso de inhibidores de la Aldosa reductasa (IAR) es una propuesta para inhibir la formación de catarata. Un ejemplo de IAR es el Metilripariocromeno A. Este es un compuesto de origen natural purificado de *Ageratina arsenei* que inhibe a la AR. Los IAR al ser administrados por vía oftálmica se enfrentan a una serie de desventajas. El uso de acarreadores como las ciclodextrinas (CDs) es una alternativa para reducir estas desventajas. En este trabajo se preparó un complejo de inclusión entre una CD y el MRChA. A través de ensayos *in silico* se determinó que la CD β es la que presenta mayor afinidad a el Metilripariocromeno A. La formación de complejo se llevó a cabo por el método de secado por congelación. El complejo se caracterizó por metodologías cromatográficas. A través de ensayos *in vitro* y *ex vivo* observamos que el MRChA conserva su actividad como IAR aun estando en complejo con la CD con lo cual podemos predecir que la liberación del metilripariocromeno A si se lleva a cabo.

Keywords: Aldosa reductasa, complejo de inclusión, metilripariocromeno A.

1 Introducción

La formación de catarata ocular es una de las principales causas de ceguera en pacientes con *Diabetes mellitus* (1). En un estado de hiperglicemia, la AKR1 enzima de la vía de los polioles incrementa su actividad al metabolizar el exceso de glucosa presente en el medio. La glucosa es transformada a sorbitol, un osmolito orgánico de la célula. La acumulación intracelular de sorbitol junto con el decremento de NADPH generan alteraciones osmóticas y oxidativas que dañan a las fibras cristalineanas del ojo y promueven la opacidad del cristalino (2). Inhibidores de la AKR1 (IAR) son estudiados para prevenir esta serie de alteraciones y evitar la formación de catarata (3). El Metilripariocromeno A (MRChA) es un compuesto obtenido de *Ageratina arsenei* con actividad IAR. En un trabajo previo, este compuesto presentó una inhibición del 89% a una concentración de 0.13 mM en un ensayo *in vitro* (4).

Un medicamento ocular se enfrenta a diversas dificultades para llegar al segmento anterior del ojo, lugar donde se lleva a cabo la formación de catarata ocular (5). Biodisponibilidad de la droga, toxicidad no específica e inmunogenicidad son solo algunos de estos problemas que se tienen que superar (6). Un compuesto acarreador es necesario para mejorar características en el fármaco que logren llevarlo a su sitio de acción (7). En las últimas décadas las nanopartículas han sido utilizadas para remediar estos inconvenientes. Con ellas se ha logrado mejorar la permeabilidad de la droga, prolongación del contacto en el ojo, liberación a sitios específicos, protección de la degradación y metabolismo, estabilidad, toxicidad y efectos adversos (8).

Las ciclodextrinas (CDs) son nanopartículas que presentan estructura truncada en forma de cono con una cavidad hidrofóbica y una superficie hidrofílica, pueden estar compuestas por seis (CD- α), siete (CD- β) y ocho (CD- γ) α -1,4-D-glucopiranosidos. Su carga dual les da la habilidad de formar complejos de inclusión con diferentes compuestos químicos a través de la formación de

enlaces no covalentes (9). Esta habilidad ha generado que las CDs sean ampliamente utilizadas en la industria farmacéutica para incrementar su solubilidad acuosa, su biodisponibilidad y su estabilidad (10).

En presentaciones oftálmicas las CDs han sido utilizadas para reducir la irritación local causada por el fármaco, para mejorar la permeabilidad del fármaco a través de la cornea y como acarreadoras de fármacos (11).

En el presente estudio se llevó a cabo la formación del complejo de inclusión entre una CD y el MRChA, después se llevó a cabo su caracterización, así como la evaluación de la actividad IAR de forma *in vitro* y *ex vivo*.

2 Metodología

2.1 Proceso de purificación del MRChA

El MRChA fue purificado del extracto hexánico de *Eupatorium arsenei*. El proceso se llevó a cabo con una cromatografía en columna en la cual se usó como fase estacionaria sílica gel (200- 400 mesh) (Merck). La fase móvil fue mezclas de hexano-acetato de etilo con proporciones de (v: v) 2:8, 4:6, 6:4 y 8:2. El MRChA fue caracterizado con RMN en un espectrofotómetro Varian Mercury plus 400.

2.2 Ensayo de Acoplamiento molecular

El acoplamiento molecular se realizó con el software Autodock Vina (12). Las estructuras de las ciclodextrinas α , β , y γ y del MRChA fueron obtenidas de la base de datos Chempider. Cada una de estas fue optimizada con Teoría del funcional de densidad en el nivel de teoría B3LYP/6-31116t

(d. p) empleando software Gaussiano 16 (13). Los resultados fueron analizados en el programa Discovery Studio (14).

2.3 Preparación del complejo β -Ciclodextrina/Metilripariocromeno A y de la mezcla física

Una mezcla física de MRChA y CD- β fue preparada a proporción 1:1. El MRChA y la CD- β se pesaron, se mezclaron con ayuda de un mortero y se almacenaron a -20 °C. El complejo de inclusión MRChA-CD β se preparó por el método de freeze-drying a una proporción 1:1. Cantidades equimolares de MRChA y CD- β se pesaron a una concentración de 1 mM. El MRChA se disolvió en acetona. La CD- β se disolvió en agua. Ambas disoluciones se mezclaron y se mantuvieron en movimiento a 400 rpm durante 24 h. La acetona presente en la mezcla se evaporó con ayuda de un rotavapor. La mezcla obtenida se filtró y se congeló a -80 °C. Posterior a esto el agua presente en la mezcla se liofilizó a -50 °C por ± 30 h. La muestra liofilizada es el complejo MRChA-CD β el cual fue almacenado a -20 °C (15).

2.4 Caracterización del complejo MRChA-CD β

2.4.1 Espectroscopía Ultravioleta visible (UV vis)

Los espectros de UV vis del MRChA, la CD- β , el complejo MRChA-CD β y la mezcla física fueron obtenidos usando un espectrofotómetro visible ultravioleta Cary Win 50 Bio (Varian) a un intervalo de lectura de 190-800 nm. Las muestras fueron disueltas en agua a temperatura ambiente.

2.4.2 Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

El ensayo de RMN de cada una de las muestras (MRChA, la CD- β , el complejo MRChA-CD β y la mezcla física) se realizó en el equipo Varian Mercury plus 400 a temperatura ambiente. Las muestras se disolvieron en DMSO. El tetrametilsilano se usó como referencia interna.

2.4.3 Espectroscopía infrarroja (IR)

El espectro IR fue obtenido de un espectrofotómetro Thermo Scientific modelo Nicolet Is10 empleando la técnica ATR. Las muestras fueron escaneadas en un intervalo de 4000-400 cm^{-1} .

2.4.4 Difracción de Rayos X

Los patrones de difracción de Rayos X fueron obtenidos con un difractómetro Bruker D8 Advance con diseño DAVINCI equipado con deflector lineal de silicio el cual opera con radiación $\text{CuK}\alpha$ cuya longitud de onda es de 1.54060 Å. La potencia de excitación fue de 40 kV, con un incremento de 0.02 ° y una velocidad de ángulo de 2.0° s por paso. El rango de barrido fue de 2θ de 4°-60°.

2.4.5 Microscopía electrónica de barrido (MEB)

La morfología de superficie de cada una de las muestras se observó a través de MEB en un microscopio JEOL JSM 7600F. Las muestras se fijaron en un trozo de aluminio adherido mediante cinta adhesiva de carbono de doble cara y revestida con oro. Las imágenes se obtuvieron con 5.0 kV de voltaje de aceleración y 800 X de aumento.

2.5 Actividad de la AKR1 recombinante de humano en presencia del complejo MRChA-CD β

La actividad enzimática se midió siguiendo al método clásico de oxidación del NADPH^+ (15). Una mezcla de reacción se preparó en el siguiente orden, 650 μl de 1 mM de amortiguador de fosfato de potasio a pH 7, 100 μl de 100 mM de gliceraldehído, 100 μl de 2 mM de NADPH^+ , 50 μl de 50 mM de sulfato de litio, 2.5 μl de enzima hrAR (SIGMA) disuelta en amortiguador Tris pH 8 (1:15 enzima-amortiguador) y complejo MRChA-CD β . La mezcla de reacción se incubó en baño de agua a 37 °C por 3 minutos. 100 μl de 100 mM de gliceraldehído se adicionaron y se midió la

caída de absorbencia de forma inmediata a 340 nm por 3 minutos. El blanco de la reacción se realizó sin adicionar los 100 μ l de 100 mM de gliceraldehído.

2.6 Cultivo de cristalinos de conejo inducidos a catarata en presencia del complejo MRChA-CD β

Cristalinos obtenidos de ojos de conejo (raza Nueva Zelanda, 3 meses de edad) previamente esterilizados con hipoclorito de sodio se sembraron en medio 199 (Sigma Aldrich M3769) suplementado con suero fetal bovino al 0,5%, penicilina-estreptomicina al 1%, neomicina 0,5 mg/ml, anfotericina B 2,5 μ g/ml y bicarbonato de sodio como amortiguador de pH. Los cristalinos fueron sometidos a los siguientes tratamientos: glucosa 55 mM (induce catarata), epalrestat 4 μ M (control positivo para la inhibición) y complejo de inclusión MRChA o MRChA-CD β (0,87 mM). Estos se mantuvieron a 37 °C en una incubadora humidificada con una atmósfera de 5% CO₂/95% aire durante 6 días. El medio se renovó cada 48 h. Las fotografías de las lentes se tomaron cada 24 h en equipos con el sistema de imágenes Gel 200, transiluminación UV. El contraste de la foto se invirtió. El tamaño de los cristalinos se homogeneizó en el programa Photoshop. Los píxeles fueron cuantificados con el programa ImagenJ.

2.7 Cuantificación de sorbitol en cristalinos de conejo inducidos a catarata en presencia y ausencia del complejo MRChA-CD β

La cuantificación de sorbitol se realizó utilizando un espectrofotómetro de microplacas (EPOCH) y un kit enzimático, D-Sorbitol/Xilitol (Megazyme; Bray, Wicklow, Irlanda). La absorbancia se midió a una longitud de onda de 492 nm. Las concentraciones de sorbitol en mg/ml se obtuvieron siguiendo las instrucciones del fabricante así como su ecuación matemática.

3 Resultados y Discusión

3.1 Ensayo de Acoplamiento molecular

En la vía de administración oftálmica las CDs son utilizadas para mejorar la irritación local causada por fármacos, incrementar la permeabilidad a través de la córnea y como acarreadoras (16). Esto se logra con la formación de complejos de inclusión entre una CD y el fármaco. Para conocer que CD tiene mayor afinidad al MRChA se realizó un Docking molecular entre las CDs α , β , γ y el MRChA en el programa Autodock Vina. Energías de afinidad de -4.4, -5.1 y -5.5 fueron obtenidas para las ciclodextrinas α , β y γ respectivamente. Las tres CDs presentaron formación de tres interacciones. La CD- γ presentó una interacción desfavorable por ello se descartó y se procedió a hacer el complejo con la CD- β que es la que mayor energía de afinidad presenta.

3.2 Preparación del complejo MRChA-CD β y de la mezcla física

La preparación del complejo MRChA-CD β se realizó a través del método de freeze-drying. Este método fue elegido debido a que se considera el más eficiente para proteger al ligando de una descomposición química debido a las bajas temperaturas con las que se procesa y la reducción del contenido de humedad a niveles muy bajos (17). La composición del complejo fueron cantidades equimolares de 1 mM de CD- β y 1 mM de MRChA. Un rendimiento del 85% fue obtenido. Como control negativo a formación del complejo se preparó una mezcla física con las mismas cantidades, pero sin el procesamiento correspondiente al método.

3.4 Caracterización del complejo MRChA-CD β

La caracterización del complejo MRChA-CD β se realizó con diferentes técnicas espectrofotométricas. Las cuales ayudaron en conjunto a demostrar si la formación del complejo MRChA-CD β fue obtenida. Esto a través de la comparación de las señales del complejo y la mezcla física que cumple el papel de control negativo.

3.4.1 Espectroscopía Ultravioleta visible (UV vis)

Los espectros UV visibles obtenidos del MRChA, la CD- β , el complejo MRChA-CD β y la mezcla física presentan señales diferentes para todas las muestras fueron obtenidas. Diferencias entre el complejo y la mezcla física en las zonas de 210 nm y entre 280-290 nm son la evidencia de que se logró la formación del complejo .

3.4.2 Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

La RMN es considerada una de las mejores herramientas para la caracterización de la formación de complejos de inclusión con CDs (18). Los resultados de RMN para el MRChA, la CD- β , el complejo MRChA-CD β y la mezcla física presentan diferencias. El espectro del complejo presenta señales en las zonas de 2.3, 1.25 y 1.1 ppm que no se observan en la mezcla física, evidenciando cambios químicos en las estructuras de los constituyentes debidas a la formación del complejo. La mezcla física presenta ambas señales del MRChA y la CD β .

3.4.3 Espectroscopía infrarroja (IR)

Los resultados obtenidos en la espectroscopia IR para el MRChA, la CD- β , el complejo MRChA-CD β y la mezcla física demuestran cambios vibracionales producidos por la formación del complejo. El espectro de la CD- β presenta señal ancha en 3700-3000 cm^{-1} que puede ser asignado a los puentes de hidrógeno de la estructura de la CD. Esta señal fue reducida en intensidad en el espectro del complejo, indicando la reducción en el número de grupos hidroxilo. Esto no se observa en el espectro de la mezcla física. La señal en 2900 cm^{-1} correspondiente a la CD- β desaparece en el espectro del complejo y se mantiene en el espectro de la mezcla física. Las señales correspondientes a el MRChA decremantan en intensidad. Algunas desaparecen en el espectro del complejo MRChA-CD β . Algunas de estas se mantienen en el espectro de la mezcla física. Todo esto indica que la formación del complejo fue exitosa.

3.4.4 Difracción de Rayos X

El MRChA, la CD- β , el complejo MRChA-CD β y la mezcla física fueron analizados por difracción de rayos X. En el espectro del MRChA, la CD- β se observan señales agudas y definidas debido a su forma cristalina. En la mezcla física se observa el empalme de las señales del MRChA y la CD- β . Con lo cual podemos definir que se conserva la forma cristalina de ambas muestras. En los resultados obtenidos para el complejo MRChA-CD β las señales se pierden, observando pocas señales anchas y cortas. Esto indica la pérdida de la morfología cristalina del MRChA y la CD- β debido a la formación del complejo.

3.4.5 Microscopia electrónica de barrido (MEB)

Para visualizar cambio en la morfología de superficie del el complejo MRChA-CD β se empleó MEB. A través de la cual se observó cambio en la morfología de las diferentes muestras.

La morfología de superficie del MRChA se observa una capa extendida sobre todo el campo debido a que el compuesto es oleoso. Esto hace mantenerse compacto y formar una capa. En la imagen de la CD- β se observan placas anchas grandes irregulares correspondientes a los cristales de las CDs. En la imagen de la mezcla física se observa que el MRChA se aglomero y se adherió a la superficie de las placas de la CD- β . Las CD- β no presenta cambios debido a que no hubo interacción entre ellos. La imagen obtenida para el complejo MRChA-CD si presentó cambios. Con una morfología de placas laminares delgadas y más pequeñas. Este cambio en la estructura es debido a la formación del complejo.

3.5 Actividad de la AKR1 recombinante de humano en presencia del complejo MRChA-CD β

Entre un compuesto huésped y su ligando existen diferentes tipos de interacción: interacciones débiles en las que es posible la disociación entre ellos e interacciones fuertes donde se requiere energía para la disociación o simplemente ésta no se logra (19). Para evaluar si es posible lograr la disociación del complejo se evaluó la inhibición a la AKR1 con el complejo MRChA-CD β en un medio acuoso. El complejo se disolvió en agua y se realizó el ensayo de inhibición a la enzima hrAR. El resultado obtenido fue una inhibición del 91%. Este valor es similar al 87% de inhibición obtenido para el MRChA puro. Lo cual nos indica que estas condiciones el MRChA es liberado por la CD- β y logra llevar a cabo su acción como inhibidor. Con ello podemos predecir que una vez que el complejo MRChA-CD β llegue al ambiente acuoso del humor vítreo podrá ser liberado de la CD- β para actuar como ARI.

3.6 Estabilidad del complejo β -Ciclodextrina/Metilripariocromeno A

El complejo MRChA-CD β en forma sólida se almacenó en frasco de vidrio sellado y protegido por la luz durante 18 meses a -80 °C. Posteriormente se sometió a espectroscopia IR para evaluar estabilidad del complejo este tiempo. El espectro obtenido se comparó con el espectro que se obtuvo del complejo recién preparado. La comparación entre ambos espectros no presentó diferencia lo cual nos indica que el complejo se mantiene estable bajo estas condiciones durante 18 meses.

3.7 Cultivo de cristalinos de conejo inducidos a catarata en presencia y ausencia del complejo MRChA-CD β

Un ensayo *ex vivo* es un enfoque alternativo para estudiar el comportamiento de un órgano frente a un tratamiento específico fuera del organismo. Algunas de las ventajas de este modelo son un control estricto del entorno físico y químico, un uso reducido de animales y un bajo costo. El entorno de estos ensayos es lo más cercano al entorno real donde se conserva la citoarquitectura intercelular y los procesos metabólicos representan más la situación *in vivo*. Para evaluar la inhibición de la formación de catarata por el complejo se realizó un ensayo *ex vivo* donde se cultivaron cristalinos de conejo por 6 días. La formación de catarata fue inducida con 55mM de glucosa. Diferentes tratamientos fueron administrados a los cristalinos para inhibir la formación de catarata. Los resultados se observa una área blanca corresponde a la formación de catarata y el área negra a transparencia del cristalino. En el control negativo que no tiene ningún tratamiento, se observa que la transparencia del cristalino permanece hasta los 6 días. Con la administración de 55 mM de glucosa se observó que al 6to día se lleva a cabo la completa opacidad del cristalino. El epalrestat un ARI sintético considerado entre los más potentes fue usado como control positivo a inhibición. En el tratamiento de MRChA y el complejo MRChA-CD β observamos que la inhibición del MRChA se mantiene aunque esté en complejo con la CD β por lo que podemos definir que la formación del complejo no interviene en la acción ARI del MRChA. En el último tratamiento se administró al complejo MRChA-CD β sin inducir a catarata y podemos observar que el cristalino no presenta alteración por lo que podemos definir que en este ensayo hasta el día 6 el complejo no genera toxicidad que dañe la integridad del cristalino.

Los resultados cuantitativos del ensayo de cultivo de cristalinos obtenidos con el conteo de pixeles de cada una de las imágenes y la cuantificación de la cantidad de sorbitol presentes en los cristalinos para los diferentes tratamientos podemos definir que la presencia de opacidad del

cristalino es proporcional a la cantidad de sorbitol y esto nos ayuda a respaldar los resultados de nuestro ensayo *ex vivo*.

4 Conclusión

La formación de complejo MRChA-CD β se logró y se demostró que el MRChA mantiene su actividad IAR de forma *in vitro* y *ex vivo* aun estando en complejo con CD- β por lo que esta sería una alternativa viable para acarrear al MRChA y que logren llegar a su sitio de acción en un ensayo *in vivo*.

5 Bibliografía

1. Peterson, S.R.; Silva, P.A.; Murtha, T.J.; Sun, J.K. Cataract Surgery in Patients with Diabetes: Management Strategies. Semin Ophthalmol 2017, 1-8. DOI: 10.1080/08820538.2017.1353817.
2. Chylack, L.T.; JR; M.D; Cheng, H.M.; O.D; Ph.D. Sugar Metabolism in the Crystalline Lens. Surv Ophthalmol 1978, 23, 26-34. DOI: 10.1016/0039-6257(78)90195-9.
3. Alexiou P. Pegklidou K, Chatzopoulou M, Nicolaou I, Vassilis J, (2009), Aldose reductase enzyme and its implication to major health problems of the 21 century, Current Medicinal Chemistry, 16, 734-752.
5. Harezlak, K., & Kasprowski, P. (2018). Application of eye tracking in medicine: A survey, research issues and challenges. Computerized Medical Imaging and Graphics, 65, 176-190.
6. Davies, I., Williams, A. M., & Muir, K. W. (2017). Aids for eye drop administration. survey of ophthalmology, 62(3), 332-345.
7. Radhakrishnan, K., Sonali, N., Moreno, M., Nirmal, J., Fernandez, A. A., Venkatraman, S., & Agrawal, R. (2017). Protein delivery to the back of the eye: barriers, carriers and stability of anti-VEGF proteins. Drug discovery today, 22(2), 416-423.

8. Radhakrishnan, K., Sonali, N., Moreno, M., Nirmal, J., Fernandez, A. A., Venkatraman, S., & Agrawal, R. (2017). Protein delivery to the back of the eye: barriers, carriers and stability of anti-VEGF proteins. *Drug discovery today*, 22(2), 416-423.
9. Benjamin Gabriel Poulson, Qana A. Alsulami, Abeer Sharfalddin, Emam. F. El Agammy. Fouzi Mouffouk, Abdul-Hamid Emwas, Lukasz Jaremko and Mariusz Jaremko (2022), Polysaccharides 2022, 3, 1–31. <https://doi.org/10.3390/polysaccharides3010001>
10. Max Petitjean, Iñigo X. García-Zubiri, José Ramón Isasi, (2021), History of cyclodextrin-based polymers in food and pharmacy: a review, *Environmental Chemistry Letters* (2021) 19:3465–3476. <https://doi.org/10.1007/s10311-021-01244-5>
11. Das B and Srivastava SK, (1985), Purification and properties of Aldose Reductase and Aldehyde Reductase II from human erythrocyte, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 238 (2), 670-679.
12. Trott, O.; Olson, A.J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem* 2010, 31, 455–461. DOI: 10.1002/jcc.21334
13. Morris, G. M., & Lim-Wilby, M. (2008). Molecular docking. *Molecular modeling of proteins*, 365-382. 14. Dassault Systèmes BIOVIA, Discovery Studio Modeling Environment, Release 2017, San Diego: Dassault Systèmes, 2016. URL: <https://discover.3ds.com/>
15. Stella, V. J., Rao, V. M., Zannou, E. A., & Zia, V. (1999). Mechanisms of drug release from cyclodextrin complexes. *Advanced drug delivery reviews*, 36(1), 3-16.
16. Saokham, P., Muankaew, C., Jansook, P., & Loftsson, T. (2018). Solubility of cyclodextrins and drug/cyclodextrin complexes. *Molecules*, 23(5), 1161.

17. Pralhad, T., & Rajendrakumar, K. (2004). Study of freeze-dried quercetin–cyclodextrin binary systems by DSC, FT-IR, X-ray diffraction and SEM analysis. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 34(2), 333-339.
18. Linde, G. A., Junior, A. L., de Faria, E. V., Colauto, N. B., de Moraes, F. F., & Zanin, G. M. (2010). The use of 2D NMR to study β -cyclodextrin complexation and debittering of amino acids and peptides. *Food Research International*, 43(1), 187-192.
19. Stella, V. J., Rao, V. M., Zannou, E. A., & Zia, V. (1999). Mechanisms of drug release from cyclodextrin complexes. *Advanced drug delivery reviews*, 36(1), 3-16.

CAPÍTULO 3.- Diterpenos tipo labdano de *Ageratina jocotepecana* como inhibidores de la Aldosa reductasa

Diterpenos tipo labdano de *Ageratina jocotepecana* como inhibidores de la aldosa reductasa

Resumen

Ageratina es un género que se encontrará en el centro de América cuyas especies están implicadas en funciones relacionadas con la mejoría de la salud humana. Especies como *A. jahnii* y *A. pichinchensis* han mostrado propiedades contra la leishmaniosis. Otros metabolitos secundarios obtenidos del género *Ageratina* también han demostrado propiedades como antifúngicos y antibacteriales. Sin embargo, amplia es la brecha que se debe cruzar para conocer más acerca de las propiedades biológicas de *A. jocotepecana* pues es limitada la información que se tiene de ella. La búsqueda de compuestos que inhiban a la enzima AR para prevenir la formación de catarata sigue siendo una posibilidad para mejorar la calidad de vida de pacientes con Diabetes mellitus. En este trabajo se evaluó a *A. jocotepecana* como ARI. Los resultados positivos de inhibición nos dirigieron a purificar el compuesto inhibidor de la enzima. Este compuesto inhibió a la AR de forma *in vitro* y *ex vivo*. En el ensayo *ex vivo* se observó toxicidad causada por este compuesto a concentraciones altas en cristalinos de conejo. Esta toxicidad se logró atenuarse mediante la formación de un complejo de inclusión entre la CD- β y el compuesto inhibidor.

1. Introducción

El género *Ageratina* (familia Asteraceae, tribu Eupatorieae, subtribu Eupatoriinae), es un grupo de especies vegetales taxonómicamente complejas con un importante centro de diversidad en el continente americano. En Europa y Asia oriental se han reportado pocas especies (1). ciento cuarenta y tres especies del género *Ageratina* se han reportado en el área de 398 especies descritas en The Plant List hasta septiembre de 2020. La mayor parte de la información disponible se refiere a sus propiedades medicinales e insecticidas de: *Ageratina brevipes*. (DC) R. M. King & H. Rob, *Ageratina jahnii* (B. L. Rob.) R. M. King & H. Rob (synonym *Ageratina stevioides*), *Ageratina pichinchensis* (Kunth; synonym *Ageratina ibaguensis*, *Ageratina aschenborniana* and *Ageratina bustamenta*), and *Ageratina adenophora* (Spreng.) (2, 3, 4). El extracto de hojas acuoso de *Ageratina jahnii* y metanolico de *A. pichinchensis*, así como su aceite esencial presentó actividad adulticida contra *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae) (5). Actividad larvicida ha sido reportada para el extracto acetónico de *A. adenophora* contra *Aedes aegypti* y *Culex quinquefasciatus* (6). Metabolitos secundarios del género *Ageratina* posee una amplia variedad de actividades biológicas incluyendo actividad farmacológica, antifúngica, antibacterial e insecticida.(6, 7, 8). Los constituyentes químicos reportados en el género *Ageratina* también son descritos en la excelente revisión de, en ella reportan 149 constituyentes químicos, agrupados en las familias químicas; monoterpenos, sesquiterpenos cíclicos, diterpenos, triterpenos, flavonoides, alcaloides del tipo pyrrolizidina y aceites esenciales (9). 10 benzoiloxi-8,9-deshidroxi-6-isobutirato de timol purificado de *A. glabrata* presentó actividad antidiarréica (10). Dihydrobenzofuran y 3-epilupeol purificados de *A. pichichensis* presentaron propiedad antiinflamatoria (11). *A. jocotepecana* es una planta que crece en el centro de México, (9). *A. jocotepecana* en este trabajo presentó inhibición a la enzima Aldosa reductasa. La enzima Aldosa reductasa es la protagonista

en la incidencia de complicaciones secundarias de la *Diabetes mellitus* causadas por hiperglucemia crónica (13). Se sabe que esta enzima transforma el exceso de glucosa a sorbitol. La acumulación intracelular de sorbitol genera una serie de alteraciones que causan estrés osmótico y oxidativo los cuales producen un daño celular (14). La formación de catarata ocular es resultado de este daño celular. En el ojo las principalmente dañadas por la acumulación de sorbitol son las fibras cristalíneas encontradas en el cristalino ocular. Estas sufren de lisis y se van acumulando en el interior del cristalino generando la opacidad de este. Alteración en la vista o la pérdida de esta son el resultado de la formación de catarata (15). Se ha documentado que la inhibición de la AR previene esta serie de alteraciones y por ende la pérdida de vista causada por catarata ocular. La búsqueda de inhibidores de la AR (ARI) ha persistido por muchos años (16). A pesar de ello son pocos los medicamentos comercializados que inhiban a la AR (17). Las ciclodextrinas son una familia de oligosacáridos cíclicos con forma de cono truncado. Estas tienen la propiedad de albergar en su parte interna compuestos lipofílicos formando complejos de inclusión (18). Las CDs son ampliamente usadas en la industria farmacéutica como excipientes para incrementar la solubilidad en agua del fármaco, mejorar la absorción del fármaco, incrementar la estabilidad y reducir la irritación local y toxicidad del fármaco (19). En este estudio se evaluó la actividad inhibitoria a la AR de compuestos purificados de *Ageratina jocospecana* y se formó un complejo de inclusión entre el compuesto inhibidor y una CD.

2. Materiales y Metodos

2.1 Preparación del extracto de *A. jocospecana*

A. jocospecana fue recolectada y secada bajo protección de la luz. La planta seca se separó en sus diferentes partes. Estas fueron cortadas en partes pequeñas y maceradas en hexano y

posteriormente en diclorometano. La parte líquida del macerado fue concentrada en rotavapor para obtener el extracto. Los extractos fueron almacenados a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

2.2 Purificación de compuestos tipo labdano de *A. jocosotepecan* Los extractos diclorometánicos de flor y hoja se utilizaron para obtener los compuestos tipo labdano. El método que se utilizó para la purificación de labdanos fue cromatografía en columna. La fase estacionaria de la columna fue sílice gel con tamaño de 200-400 mesh. La fase móvil fue mezclas de hexano y acetato de etilo. Cada compuesto se identificó por RMN y se almacenó a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ (20).

2.3 Ensayo con AKR1B1

La actividad enzimática de la AKR1B1 se obtuvo midiendo el consumo de NADPH^+ y cuantificando la concentración final de glicerol. Para ello se usó la enzima comercial Human Recombinant Aldose Reductase (Sigma Aldrich). El proceso de reacción enzimática se realizó de acuerdo con las indicaciones del proveedor. La mezcla de reacción contuvo 0.65 mM de amortiguador de fosfato de potasio a pH 7, gliceraldehido 10 mM, NADPH^+ 0.2 mM, sulfato de litio 2.5 mM y 2.5 μl de enzima AKR1B1. La mezcla de reacción se incubó en baño de agua a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 3 min. 10 mM de gliceraldehido se adicionó, se mezcló por inversión y se midió el decremento de la absorbencia a 340 nm por 3 min. La reacción enzimática se detuvo con baño María a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 min. La mezcla se centrifugó a 12000 rpm por 20 min. Al sobrenadante se midió la concentración de glicerol con un kit comercial (Sigma Aldrich F6428).

2.4 Ensayo con AKR1B4

La actividad enzimática de AKR1B4 se obtuvo siguiendo el método de Hayman y Kinoshita con algunas modificaciones (21). El extracto crudo de enzima se obtuvo de cristalinos de rata. Los ojos fueron extraídos y lavados con solución salina. Con un bisturí se realizó una incisión en el ojo

para extraer el cristalino. Los cristalinos se homogenizaron en búfer de fosfatos de potasio 0.1 M a pH 7.2 con inhibidores de proteasas (Sigma Aldrich P9599). La mezcla de reacción contenía búfer de fosfato de potasio 0.1 M a pH 6.8, mercaptoetanol 5 μ M, 8 mg de proteína/ml de extracto crudo de enzima, NADPH⁺ 40 mM y gliceraldehído 0.01 mM. La reacción enzimática se monitorizó por la caída de absorbencia en un espectrofotómetro visible ultravioleta a 340 nm por 2 min. La lectura se inició al agregar el NADPH⁺. Posteriormente se midió la concentración final de glicerol.

2.5 Ensayo con enzima de eritrocito de humano

Una toma de la muestra sanguínea venosa de una persona sana de sexo masculino en ayuno de 8 h fue recolectada en tubo con EDTA como anticoagulante. La muestra fue lavada con solución salina por 3 veces. A esta se le adicionaron 2-mercaptoetanol 1 mM e inhibidores de proteasas (SIGMA P9599). Posteriormente la muestra se congeló a -40 °C por 3 h, se descongeló por 1 h y el ciclo de congelación y descongelación se repitió 3 veces y se centrifugó a 12,000 rpm por 15 min. El sobrenadante fue utilizado como extracto crudo de enzima. La mezcla de reacción contenía fosfatos de potasio 0.1 M a pH 7, mercaptoetanol 5 μ M, 8 mg de proteína/ml de extracto crudo de enzima, NADPH⁺ 40 mM y gliceraldehído 0.01 mM. La reacción enzimática se llevó a cabo a 37 °C y fue monitorizada por la caída de absorbencia en un espectrofotómetro UVvis a 340 nm por 2 min. Después se midió la concentración final de glicerol (22).

2.6 Ensayo con AKR1C1

La actividad de la enzima 20 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa recombinante de humano expresada en *E. coli* (AKR1C1) (Sigma Aldrich SRP6087) se midió con una mezcla de reacción que contenía búfer de fosfatos de potasio 0,1 M a pH 6.8, mercaptoetanol 5 μ M, NADPH⁺ 40 mM

gliceraldehído 0.01 mM y 3 μ l de enzima AKR1C1. La reacción enzimática se monitorizó por la caída de absorbancia a 340 nm por 2 min. La concentración final de glicerol también fue medida.

2.7 Ensayo de inhibición

Para el ensayo de inhibición de las diferentes enzimas se midió la actividad enzimática de cada enzima en presencia del Ácido 13-*epi*-labdanólico. Este se disolvió en DMSO.

2.8 Cuantificación de sorbitol

La cuantificación de sorbitol se realizó con el kit enzimático D-Sorbitol/Xilitol (Megazyme; Bray, Wicklow, Irlanda). La absorbancia se midió a una longitud de onda de 492 nm. Las concentraciones de sorbitol se obtuvieron siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.9 Docking molecular

El software Autodock Vina fue usado para realizar el acoplamiento molecular (23). Las estructuras en 3D fueron obtenidas de la base de datos Chempider. Cada una de estas fueron optimizadas con Density Functional Theory at the B3LYP/6-31116t (d. p) level of theory employing Gaussian 16 Software (24). El programa Discovery Studio fue utilizado para analizar los resultados (25).

2.10 Cultivo de cristalino de conejo

Los cristalinos fueron obtenidos de ojos de conejos de la raza New Zealand de 3 meses de edad. Estos fueron esterilizados y posteriormente cultivados en medio 199 (Sigma Aldrich M3769). Al medio de cultivo se le adicionó suero fetal de bovino 0.5%, bicarbonato de sodio, penicilina-estreptomicina 1%, neomicina 0.5 mg/ml y anfotericina B 2.5 μ g/ml. Glucosa 55 mM fue usada para inducir a catarata. Epalrestat 4 μ M fue administrado como control positivo. El ácido 13-*epi*-labdanólico y su complejo fueron administrados a diferentes concentraciones: 0.4, 4, 40, y 400

μM . El cultivo fue mantenido a 37 °C en una incubadora humidificada con una atmosfera de 5% de CO_2 /95% de aire durante 6 días. Cada 48 h fue renovado el cultivo. En un equipo con Gel 200 imaging system, UV transillumination fueron tomadas las fotografías de los cristalinos cada 24 h. El contraste de la foto fue invertido. En el programa Photoshop fue homogenizado el tamaño de los cristalinos. La cantidad de pixeles del área blanca correspondiente a la formación de catarata fue cuantificada en el programa ImagenJ.

2.11 Formación del complejo

Una mezcla física de Ácido 13-*epi*-labdanólico y CD- β fue preparada a proporción 1:1. El Ácido 13-*epi*-labdanólico y la CD- β se pesaron, se mezclaron con un mortero y se almacenaron a -20 °C. El complejo CD- β : Ácido 13-*epi*-labdanólico se preparó por el método de freeze-drying a una proporción 1:1. Cantidades equimolares de Ácido 13-*epi*-labdanólico y CD- β se pesaron a una concentración de 1 mM. El Ácido 13-*epi*-labdanólico se disolvió en acetona. La CD- β se disolvió en agua. Ambas disoluciones se mezclaron y se mantuvieron en movimiento a 400 rpm durante 24 h. La acetona presente en la mezcla se evaporó en un rotavapor. La mezcla obtenida se filtró y se congeló a -80 °C. Posterior a esto el agua presente en la mezcla se liofilizó a -50 °C por ± 30 h. El complejo CD- β :ácido 13-*epi*-labdanolico fue almacenado a -20 °C (26).

2.12 Caracterización del complejo

2.12.1 Espectroscopía Ultravioleta visible (UV vis)

Los espectros de UV vis del Ácido 13-*epi*-labdanólico, la CD- β , el complejo CD- β : Ácido 13-*epi*-labdanólico y la mezcla física fueron obtenidos usando un espectrofotómetro visible ultravioleta Cary Win 50 Bio (Varian) a un intervalo de lectura de 190-800 nm. Las muestras fueron disueltas en agua a temperatura ambiente.

2.12.2 Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

El ensayo de RMN de cada una de las muestras (Ácido 13-*epi*-labdanólico, la CD- β , el complejo CD- β : Ácido 13-*epi*-labdanólico y la mezcla física) se realizó en el equipo Varian Mercury plus 400 a temperatura ambiente. Las muestras se disolvieron en DMSO. Como referencia interna se usó el tetrametilsilano.

2.12.3 Espectroscopía infrarrojo (IR)

El espectro IR de las muestras fue obtenido de un espectrofotómetro Thermo Scientific modelo Nicolet Is10 con la técnica ATR a un intervalo de 4000-400 cm^{-1} .

2.12.4 Difracción de Rayos X

Los patrones de difracción de Rayos X de las muestras fueron obtenidos con un difractómetro Bruker D8 Advance con diseño DAVINCI equipado con deflector lineal de silicio el cual opera con radiación $\text{CuK}\alpha$ cuya longitud de onda es de 1.54060 Å. La potencia de excitación que se usó fue de 40 kV, con un incremento de 0.02 ° y una velocidad de ángulo de 2.0° s por paso. El rango de barrido fue de 2θ de 4°-60°.

2.12.5 Microscopia electrónica de barrido (MEB)

Las muestras fueron observadas a través de MEB en un microscopio JEOL JSM 7600F. Las muestras se fijaron en un trozo de aluminio adherido mediante cinta adhesiva de carbono de doble cara y revestida con oro. Las imágenes se obtuvieron con 5.0 kV de voltaje de aceleración y 800 X de aumento.

3. Discussion

El género *Ageratina* ha tomado relevancia en los últimos años. Plantas pertenecientes a este género presentan actividades farmacológicas frente a ciertas patologías humanas. Un ejemplo de ello es la actividad curativa de úlcera de pie diabético que genera el extracto acuoso y hexanoacetato de etilo de *A. pichichensis* (27). Otras actividades como antifúngico y antibacterial también se le han atribuido a las plantas pertenecientes a este género (28). Metabolitos secundarios con actividad farmacéutica también han sido purificados del género *Ageratina* como son 10 benzoiloxi-8,9-deshidro-6-hidroxitimol isobutirato purificado de *A. glabrata* y dihidrobenzofurano y 3-epilupeol purificados de *A. pichichensis* con actividades antidiarréicas y antiinflamatorias respectivamente (29). *A. jocotepecana* es una especie que crece en el centro de México. La AR es una enzima de la vía de los polioles que transforma la glucosa a sorbitol. Esta enzima frente a un estado de hiperglucemia crónica genera la acumulación de sorbitol. Estrés osmótico y oxidativo son el resultado de la serie de alteraciones causadas por el incremento en la actividad de la AR y la acumulación de sorbitol. La lisis celular viene como consecuencia de este estrés. La acumulación de células lisadas va formando la opacidad del cristalino o catarata ocular y con ello se va perdiendo la visión (31). Por ello la inhibición de la enzima AR es una alternativa para prevenir la formación de catarata diabética. Un escrutinio con diferentes extractos de *A. jocotepecana* fue realizado para evaluar su actividad inhibitoria hacia la AR. Extractos hexánicos y diclorometánicos de hoja, flor, tallo y raíz de *A. jocotepecana* fueron obtenidos. La actividad de la AKR1B1 se midió en presencia de cada uno de estos extractos a través de dos métodos. El primero midiendo el consumo de NADPH⁺ a través de UVvis y el segundo método fue midiendo el producto de la reacción es decir el glicerol. Los resultados obtenidos presentes en la tabla 7 indican que los extractos con mayor actividad ARI son el extracto diclorometánico de hoja con el 96% y el diclorometanico de flor con 93%. En estos dos extractos se buscó la identificación del compuesto responsable de la inhibición de la AR. García Sánchez y col. en 2015 identificaron y

purificaron de *A. jocosotepecana* como compuestos mayoritarios de hojas y flores a compuestos tipo labdano (30). Estos compuestos más la forma isomerizada y metilada del ácido catívico fueron evaluados como ARI. Los resultados obtenidos indican que el compuesto que presentó mayor inhibición fue con la fracción de labdanos que tuvo el 79%. Los compuestos derivados del ácido catívico no presentaron inhibición. Con esto demostrando que la presencia de grupos OH favorece a la inhibición de la AR. Los parámetros cinéticos de una enzima en presencia de un inhibidor ayudan a predecir el comportamiento de esta con su sustrato cuando el inhibidor ha sido administrado. Además, nos ayudan a hacer una comparación entre los valores obtenidos con diferentes inhibidores y con ello posicionar a estos como malos o buenos inhibidores (33). Comparando ambos valores podemos posicionar al ácido 13-*epi*-labdanólico en un puesto considerable como ARI. La selectividad se refiere al grado de preferencia de unión de un inhibidor a una enzima con respecto a otras enzimas. Esta ayudará a predecir si el inhibidor una vez administrado tendrá efecto sobre otras enzimas o solo inhibirá a una en específico. La unión se da en el sitio activo con una energía de afinidad de -7.4 kcal/mol. Con esto se respalda el resultado de inhibición competitiva obtenido en el ensayo *in vitro*. Las interacciones formadas fueron trece: dos puentes de hidrógeno (Val147, His110), cinco interacciones π (Fen122, Pro128, Trip2, leu300 y Trip111) y 6 fuerzas de van der Waals (Trip219, Asn160, Trip29, Tir48, Cist298 y una interacción con el NADPH⁺). La glucosa interacciona con His110, Trip111 y Tyr48 de la AKR1B1 es por ello que se da la competencia entre el labdano y la glucosa por ocupar el sitio activo de la AKR1B1 (34).

Los cultivos celulares o de órganos aislados del organismo son una herramienta para la experimentación. Estos presentan entre sus ventajas el decremento de uso de ensayos *in vivo*, decremento en inversión de espacio y de dinero y permite llevar el control de factores

fisicoquímicos y fisiológicos del medio (35). En este trabajo se evaluó la inhibición de la formación de catarata hiperglicémica en cristalinos de conejo. Los cristalinos fueron cultivados en medio 199 y se les adicionó diferentes tratamientos. Epalrestat 4 μM se usó como control positivo a inhibición. Glucosa 55 mM fue administrada para inducir a catarata. El cultivo se mantuvo por 6 días debido a que fueron la mayor cantidad de días en que el cristalino permaneció sin sufrir daño físico bajo las condiciones dadas al experimento. Cada día se tomó fotografía a los cristalinos en un transiluminador. Las fotos se viraron al contraste de color con lo cual la opacidad quedó como área blanca y la transparencia como el área negra. La cantidad de píxeles del área blanca se cuantificó en el programa ImagenJ, lo cual es directamente proporcional a la cantidad de opacidad en el cristalino. Tras los 6 días de cultivo la concentración de sorbitol de los cristalinos se midió. Tanto la opacidad del cristalino como la concentración de sorbitol son menores cuando se administra el labdano, al igual que el tratamiento con epalrestat. La menor concentración ensayada a la que se inhibe la catarata fue a 0.4 mM. Con estos hallazgos podemos concluir que el labdano inhibe la formación de catarata a través de su actividad como ARI.

Un cultivo de cristalinos con diferentes concentraciones de labdano y sin inducir a catarata fue realizado para evaluar si el cristalino permanece intacto ante la presencia del labdano es decir si este permanece viable. Los cristalinos con 4 mM de labdano presentaron una opacidad en el centro a partir del día 4, la cual se va intensificando conforme pasan los días. Esto nos da un indicio de que el labdano a esta concentración está generando daño en el cristalino el cual se manifiesta con la opacidad de este. Conforme se fue incrementando la concentración de ácido mayor fue el daño generado.

Las CDs son oligosacáridos naturales compuestos por unidades de D-glucopiranosas. Estas presentan una cavidad lipofílica y una superficie hidrofílica, lo que las hace ideales para formar

complejos de inclusión con compuestos hidrofílicos los cuales son albergados en su cavidad (36). En los últimos años han sido ampliamente usados en la industria farmacéutica por su capacidad para alterar propiedades físicas, químicas y biológicas de sus moléculas huésped. Entre las funciones que tienen la CDs está el decremento de irritación causada por un fármaco o atenuación de la toxicidad del fármaco (37). El complejo del labdano con una CD fue obtenido para buscar atenuar el daño generado por el labdano en el cristalino. Mediante Docking molecular se seleccionó la CD para formar el complejo con el labdano. La CD- α tiene -4.3 kcal/mol de energía de afinidad, cuatro puentes de hidrógeno y el acomodo del labdano no fue completamente dentro de la CD- α . La cavidad de la CD- α no es lo suficientemente grande para que el labdano quede completamente inmerso en esta. La CD- β tiene -5.3 kcal/mol de energía de afinidad, 4 puentes de hidrógeno y el acomodo del labdano es completamente dentro de la CD- β . La energía de afinidad obtenida con la CD- γ fue de -5.9 kcal/mol con 3 puentes de hidrógeno y el acomodo del labdano fue dentro de la CD con sobra de espacio dentro de la cavidad. Esto podría ser contraproducente al momento de la disociación del complejo. Con estos datos definimos que la CD- β es la ideal para formar el complejo con el labdano. La obtención del complejo puede hacerse a través de diferentes metodologías (38). Secado por congelación es la metodología más utilizada ya que esta no genera cambios químicos en las estructuras de los constituyentes (39). Además del complejo se preparó un control negativo el cual contiene a la CD- β y al labdano sin formar complejo, a este lo identificamos como mezcla física (MF). La caracterización se usa para evaluar si se logró formar el complejo CD- β : labdano es decir si logramos que el labdano interaccione en la cavidad de la CD- β . Diferentes metodologías de espectroscopia son utilizadas para la caracterización de un complejo (40). En este trabajo usamos espectroscopia UV visible, RMN, IR y rayos X, además se realizó microscopía electrónica de barrido (MEB). El labdano, la CD- β , la MF y el complejo CD- β :labdano fueron sometidos a cada una de las metodologías y

posteriormente se estudiaron sus diferencias en los resultados obtenidos. En la espectroscopia UVvis se observan diferentes señales en los diferentes espectros. El espectro del complejo tiene una señal a 215 nm la cual no se observa en los otros espectros. En la zona entre 240 y 260 nm también se observan señales diferentes entre los espectros. En la RMN los espectros del labdano y de la CD- β tienen las señales correspondientes a sus estructuras. En el espectro de la MF se observa el empalme de las señales del labdano y la CD- β . Gran diferencia se observa en el espectro del CD- β : labdano complex. El cual presenta señales a 4.25, entre 2 y 2.5 y -0.5 ppm que en el resto de los espectros no se observan. Esto nos indica la formación de una nueva estructura. En los espectros del IR el labdano presenta bandas en 3500, 3000, 1700, 1400 y 900 cm^{-1} correspondientes a la estructura del Ácido 13-*epi*-labdanólico. En el caso de la CD- β también se obtuvieron sus señales propias de su estructura. Una señal ancha muy marcada entre 3600 y 3000 cm^{-1} la cual indica la presencia de sus grupos OH. También se obtuvieron señales en 2900, 1600, 1400 y entre 1200-900 cm^{-1} . En la MF se observa el empalme de los espectros del labdano y la CD- β pues estos no se encuentran formando complejo. Las diferencias más destacadas en el espectro del complejo son el decremento en la señal entre 3600-3000 cm^{-1} observado en el espectro de la CD- β . Las señales en 1700, 1200 y 1400 cm^{-1} presentes en el espectro de la CD- β desaparecen en el espectro del complejo. El patrón de rayos X para la CD- β y el labdano presentan señales agudas e intensas debido a su forma cristalina. Estas señales permanecen en el caso de la MF debido a que aún mantienen su forma cristalina. Estas señales se pierden en el complejo CD- β : labdano. Donde observamos la ausencia de señales definidas debido a la formación del complejo que hace perder la forma cristalina del labdano y la CD- β . Cambio en la morfología de superficie de las diferentes muestras fue observado. El labdano se observa como cristales pequeños en forma de aguja. La CD- β tiene forma de placas anchas e irregulares la cual es la forma característica de las CDs. La morfología del labdano y la CD- β no se alteran al formar

la MF pues siguen observándose los cristales en forma de aguja y las placas anchas. En el complejo CD- β : labdano hay un cambio completo de la morfología. En este caso se observan láminas delgadas, más pequeñas e irregulares. Con todos estos hallazgos de los cambios generados en los espectros y la morfología del complejo CD- β : labdano podemos concluir que se logró la formación del complejo entre el labdano y la CD- β .

Para que el labdano cumpla con su función ARI, este tiene que ser liberado de la CD- β en su sitio de acción, es decir tiene que llevarse a cabo la disociación del complejo CD- β : labdano. De no ser así el labdano quedará atrapado en las CD- β y no inhibirá a la AR. La actividad de la AR en presencia del complejo CD- β : labdano fue medida en un ambiente acuoso. Gran parte de los fármacos oculares terminan en el humor vítreo. El cual está formado en su mayoría por agua por lo que se considera que ahí existe un ambiente acuoso. Por ello el complejo se disolvió en H₂O y posteriormente se hizo el ensayo de la actividad de la AKR1B1. La inhibición observada fue de 85% mostrando que bajo estas condiciones y en este medio se logra la disociación del complejo CD- β : labdano.

La evaluación de la estabilidad del complejo con respecto al tiempo ayuda a definir su período de vida útil. El complejo CD- β : labdano recién preparado se almacenó a -20 °C por 18 meses. Este se llevó a IR y posteriormente se compararon los espectros del complejo con y sin almacenamiento. Cambios en las señales no fueron observadas con lo cual deducimos que las estructuras permanecen iguales. Con ello se considera que el complejo CD- β : labdano es estable bajo estas condiciones y a lo largo de este tiempo.

El ensayo de viabilidad de los cristalinos de conejo se realizó nuevamente con el complejo CD- β : labdano (4 μ M de labdano). Los cristalinos presentan menor opacidad comparada con el ensayo con labdano. Lo cual indica que con la formación del complejo CD- β : labdano se logró atenuar el

daño causado por el labdano en los cristalinos de conejo. También se observó que este mantiene su actividad inhibitoria de formación de catarata hiperglicémica aun cuando este es administrado en forma de complejo. Esto respalda los resultados de disociación obtenidos de forma *in vitro*.

5. Conclusiones

El complejo CD- β : labdano obtenido de *A. jocotepecana* inhibe a la AKR1B1 de forma *in vitro* presentando selectividad a esta enzima comparada con otras AKRs. También inhibe la formación de catarata hiperglicémica en cristalino de conejo sin producir daño secundario al cristalino.

6. References

1. Katinas L., Gutierrez D., Grossi M., y Jorge V. (2007) Panorama de la familia *Asteraceae* (= Compositae) en la República Argentina, Boletín de la sociedad argentina de Botanica. 42 (1-2): 113 - 129.
2. Romero-Cerecero O., Zamilpa A., Jiménez-Ferrer J.F., Rojas-Bribiesca G., Román-Ramos R., Tortoriello J, (2008) Double-blind clinical trial for evaluating the effectiveness and tolerability of *Ageratina pichinchensis*, extract on patients with mild to moderate onychomycosis. a comparative study with ciclopirox, Planta Medicinal 74:143014352008,
3. Jiménez-Ferrera J.E., Rojas-Bribiesca G. and Tortoriello J.(2009), Clinical trial to compare the effectiveness of two concentrations of the *Ageratina pichinchensis* extract in the topical treatment of onychomycosis, Journal of Ethnopharmacology 126:74–78
4. Torres, L., Rojas, J., Rondón, M., Morales, A., and Nieves, E. (2017). Insecticide activity of *Ageratina jahnii* and *Ageratina pichinchensis* (Asteraceae) against *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae). Advanced Biomedical Research, 6(1), 53.

5. Torres-Barajas L., Rojas-Vera J., Morales-Méndez A., Rojas-Fermín L., Lucena M and Buitrago A., (2008), Chemical composition and evaluation of antibacterial activity of essential oils of *Ageratina jahnii* and *Ageratina pichinchensis* collected in Mérida, Venezuela, Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas 12 (1): 92 - 98
6. Montoya Quino J., Linares Perea E., Torres Marquina I., Vicente Orellana J.A., and Galán De Mera A. (2017) *Ageratina neblinensis* (Asteraceae, Eupatorieae), una nueva especie para el norte del Perú, Gayana Botanica 74(2):, 208187-292, 2017
7. Man-Li Z., Ming W., Jian-Jian Z., Dianne I., Yu-Cheng G. and Qing-Wen Sh. (2008), Chemical Constituents of Plants from the Genus *Eupatorium*. Chemistry & Biodiversity – Vol. 5
8. Bustos-Brito C., Vázquez-Heredia V. J., Calzada F., Yépez-Mulia L., Calderón J.S., Hernández-Ortega S., Esquivel B., García-Hernández N., Quijano L. (2016)-Antidiarrheal thymol derivatives from *Ageratina glabrata*. structure and absolute configuration of 10-benzoyloxy-8,9-epoxy-6- hydroxythymol isobutyrate, Molecules, 2016, 21, 1132
9. Sánchez-Ramos M., Marquina Bahena S, Romero-Estrada A, Bernabé-Antonio A, Cruz-Sosa F., Gonzáles-Christen, Acevedo-Fernández J.J, Perea-Arango I. and Alvarez Laura, (2018) Establishment and phytochemical analysis of a callus culture from *Ageratina pichinchensis* (Asteraceae) and its anti-inflammatory activity. Molecules 2018, 23, 1258; doi:10.3390/molecules23061258
10. Jerzy Rzedowski end Calderón de Rzedowski (2005), *Crepis capillaris* Wallr. (*Compositae, Lactuceae*), Una ADVENTICIA DE MÉXICO adición a la flora adventicia de México, Acta Botanica Mexicana 73: 69-73

11. Hayman S., Kinoshita J. H., (1965), Osalation and properties of lens aldose reductase, *The Journal of Biological Chemistry*, 240, 2, 867-872
12. WaiHoT., Kathleen A. M., and John H., (2012), Aldose reductase, oxidative stress, anddiabetic mellitus, *Frontiers in Pharmacology, Experimental Pharmacology and Drug Discovery*, 3, 87, 1-8
13. Sapna T., Sonu K. g., Villayat A., Priyanka S. and Malkhey V., (2021), Aldose Reductase: a cause and a potential target for the treatment of diabetic complications, *Archiv der Pharmazie*, 44:655–667
14. Balestri F., Moschini R., Mura U., Cappiello M. and Del Corso A.(2022), In Search of Differential Inhibitors of Aldose Reductase, *Biomolecules*, 12, 485. <https://doi.org/10.3390/biom12040485>
15. Ajmer S. G., Shashikant B., Deepti P., Viney L. and Bhupinder S. S. (2016), Updates on Aldose Reductase Inhibitors for Management of Diabetic Complications and Non-diabetic Diseases, *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 16, 120-162
16. Poulson B.G., Qana A. A., Abeer S., Emam. F., El A., Fouzi M., Abdul-Hamid E., Lukasz J. and Mariusz J. (2022), Ciclodextrins: propiedades y aplicacioes estructurales, químicas y físicas, *Polysaccharides*, 3, 1–31. <https://doi.org/10.3390/polysaccharides3010001>
17. Petitjean M., García-Zubiri andIsasi J.R., (2021), History of cyclodextrin-based polymers in food and pharmacy: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 19:3465–3476. <https://doi.org/10.1007/s10311-021-01244-5>
18. Das B. and Srivastava S.K., (1985), Purification and properties of Aldose Reductase and Aldehyde Reductase II from human erythrocyte, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 238 (2), 670-679.

19. Trott, O., Olson A.J., AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal Computer Chemistry* 2010, 31, 455–461. DOI: 10.1002/jcc.21334.
20. Phillips J., Braun R., Wang W., Gumbart J., Tajkhorshid E. and Villa E. (2005) Scalable molecular dynamics with NAMD. *Journal Computer Chemistry* 26:1781–802. doi: 10.1002/jcc.20289.
21. Fletcher R. and Reeves C. M. (1964) Function minimization by conjugate gradients. *The Computer Journal*. 7 (2), 149-154.
22. Dassault Systèmes BIOVIA, Discovery Studio Modeling Environment, Release 2017, San Diego: Dassault Systèmes, 2016. URL: <https://discover.3ds.com/>.
23. Martínez G., Gómez M.A., (2007), Ciclodextrinas: Complejos de Inclusión con Polímeros, *Revista Iberoamericana de Polimeros*, 8(4), 300-312
24. Tabanca N, Bernier UR, Tsikolia M, (2010) *Eupatorium capillifolium* Essential Oil: Chemical Composition, Antifungal Activity, and Insecticidal Activity. *Natural Product Communications*. 5(9). doi:[10.1177/1934578X1000500913](https://doi.org/10.1177/1934578X1000500913)
25. Torres V., (2022), Traditional Medicine in the Health Systems of communities in Veracruz State, Mexico, *International Journal of Agriculture environment and Biotechnology*, ISSN: 2456-1878
26. Clavin M., Machoc S.A., Muñoz E., Ferraro G., Acevedo C. and Martino V., (2007). Anti-inflammatory activity of flavonoids from *Eupatorium arnottianum*, *Journal of Ethnopharmacology*, 112, 585–589
27. Caird F.I., Hutchinson M. and Pirie A., (1964) Cataract and Diabetes, *British Medical Journal*, 12;2(5410):665-8. doi: 10.1136/bmj.2.5410.665.

28. Ramirez M. A. (2008), Epalrestat: An Aldose Reductase Inhibitor for the Treatment of Diabetic Neuropathy, Pharm.D. accp. 28, 5, 553-684
29. García-Sánchez E, Ramírez-López CB, Talavera-Aleman, A, León-Hernández A, Martínez-Muñoz RE, Martínez-Pacheco MM, Gómez-Hurtado MA, Cerda-García-Rojas CM, Joseph-Nathan P, del Río RE, (2014), Absolute configuration of (13R)- and (13S) labdane diterpenes coexisting in *Ageratina jocotepecana*, Journal of Natural Products, 77, 1005-1012
30. Trott, O. and Olson, A.J. (2010) AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. Journal of Computational Chemistry, 31, 455–461. DOI: 10.1002/jcc.21334.
31. Scherer, K. R., Clark-Polner, E., and Mortillaro, M. (2011). In the eye of the beholder? Universality and cultural specificity in the expression and perception of emotion. International Journal of Psychology, 46(6), 401–435.
<https://doi.org/10.1080/00207594.2011.626049>
32. Joźsef Szejtlin (1998), Introduction and General Overview of Cyclodextrin, Chemistry, 98, 1743–1753
33. Thorsteinn L., Birna J. O., Hafren Fri-S. and SigriSu, (1993). Cyclodextrin complexation of NSAIDs: physicochemical characteristic, European Journal of Pharmaceutical Sciences, 1,95-101
34. Carneiro, S.B., Costa Duarte, F.Í., Heimfarth, L., Siqueira Quintans, J., Quintans-Júnior L.J., Veiga Júnior, V.F. and Neves de Lima, Á.A. (2019), Cyclodextrin–Drug Inclusion Complexes: *In Vivo* and *In Vitro* Approaches. International Journal of Molecular Sciences, 20, 642. <https://doi.org/10.3390/ijms20030642>

35. Tan, L., and Kong, L. (2020). Starch-guest inclusion complexes: Formation, structure, and enzymatic digestion, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(5), 780-790.
36. Szejtli, J. (1988). Cyclodextrin Inclusion Complexes. In: *Cyclodextrin Technology, Topics in Inclusion Science*, vol 1. Springer, Dordrecht.

Capítulo 4.- Activación de la Sorbitol deshidrogenasa con compuestos obtenidos de plantas nativas de Michoacán

Activación de la Sorbitol deshidrogenasa con compuestos obtenidos de plantas nativas de Michoacán

Resumen

Se consideraba que la inhibición de la enzima SDH en la vía de los polioles ayudaría a evitar la formación de catarata ocular causada por *Diabetes mellitus*. Investigaciones realizadas como es el caso de Lee y col año demostraron que la inhibición de la SDH empeora la formación de catarata ocular. Por ello nosotros proponemos activar la enzima para evitar la acumulación de sorbitol. Compuestos activadores fueron buscados en plantas nativas de Michoacán. Para ello los compuestos fueron purificados de las plantas y estos se evaluaron tanto de forma *in silico* como de forma *in vitro*. Siete de estos compuestos presentaron una activación a la SDH lo cual impulsa a continuar con esta investigación y determinar si un ensayo *ex vivo* con cristalinos de conejo y a los cuales se les administre compuesto activador de la SDH logra prevenir la formación de catarata experimental.

1. Introducción

La Sorbitol deshidrogenas (SDH) es una enzima del metabolismo de los polioles (*D*-sorbitol (*D*-glucitol), *L*-treitol, xilitol y ribitol, además, *D*-fructosa, *L*-erythrulosa, *D*-xylulosa) que se ha identificado en diversos organismos desde bacterias hasta el humano. Esta se encuentra en el citosol de la célula y el gen que la codifica es el gen SORD. Esta es una enzima tetramérica por lo que contiene 4 subunidades iguales tanto en estructura como en función. Cada una de sus subunidades tiene 356 aminoácidos. Su principal función es transformar el sorbitol a fructosa. La reacción de SDH es reversible, es decir la enzima también puede transformar la fructosa a sorbitol y esto depende del medio en el que se encuentre (1). En la reacción enzimática utiliza NAD^+ como cofactor además un ion zinc es necesario para llevar a cabo la reacción. La SDH cataliza la oxidación reversible del C2 del sorbitol a fructosa con la reducción del NAD^+ a NADH. El pH alto favorece la oxidación de sorbitol a fructosa mientras que el pH bajo favorece la reducción de

fructosa a sorbitol (2). En cada sitio catalítico de la SDH se encuentra presente un átomo de zinc el cual interacciona con CYS44, HIS64 y GLU70 de la SDH (3).

La reacción enzimática de la SDH forma parte de la segunda reacción de la vía de los polioles. Esta vía se considera la principal responsable de la formación de complicaciones secundarias de la *Diabetes mellitus* como es el caso de la formación de catarata ocular. Se ha enfatizado la importancia del incremento de la proporción NADH/NAD⁺ en el citoplasma como resultado de una excesiva oxidación de sorbitol a fructosa a través de la SDH lo cual genera un estado de oxidación y esto a la larga genera daño celular (4). En 1994 Lee y *col* realizaron un trabajo en donde usaron como modelo de estudio a ratones en los cuales sobre expresaron al gen que codifica la AR y otros a los cuales no se expresaba la SDH. Ambos ratones fueron inducidos a diabetes y llevaron una dieta de galactosa. En este estudio se evaluó la formación de catarata ocular. Los ratones que sobreexpresan la AR como es de esperarse presentan la formación de catarata de forma más temprana que aquellos ratones que no tienen sobreexpresión de la enzima. Cabe destacar el resultado obtenido en los ratones con ausencia de SDH en los cuales la incidencia de catarata es mayor y ocurre más rápido. Bajo este panorama se logra concluir que la inhibición de la SDH no favorece la inhibición de la catarata sino todo lo contrario, induce la formación de la catarata (5). Otras investigaciones demuestran que la formación de catarata es mayor cuando se administra galactosa como dieta en lugar de glucosa. Esto es debido a que la SDH no metaboliza el galactitol que es el producto del metabolismo de la galactosa a través de la SDH. Generando mayor acumulación del poliol y con ello el desbalance osmolítico es mayor (6). Se propone la activación de SDH para con ello prevenir la acumulación de SDH.

El uso simultáneo de activadores de la SDH e inhibidores de la AR podrían proveer mayor eficiencia en la inhibición de la formación de catarata ocular causada por hiperglicemia. El paso

determinante de la reacción enzimática es la disociación del complejo SDH-NADH. Se ha identificado residuos en el sitio catalítico de la SDH que podrían jugar un papel importante en la activación de la enzima como por ejemplo la Lys294 (7).

En 1990 Lindstand y *col* identificaron compuestos (haloalcoholes) que activaban a la SDH. Estos compuestos son capaces de alterar el sitio catalítico haciéndolo flexible y con ello indujeron a la disociación entre la SDH y el NADH (8).

Las plantas son fuentes de compuestos como son los metabolitos secundarios. Algunos de estos compuestos por muchos años han sido moléculas bioactivas que han ayudado a mejorar la salud del hombre así como han sido usadas como base para diseñar nuevos fármacos. Actualmente el uso de plantas medicinales se ha convertido en una alternativa para el tratamiento de enfermedades tanto en medicina veterinaria como en medicina humana. Los metabolitos secundarios se dividen principalmente en 3 grandes grupos: terpenos, compuestos fenólicos y alcaloides (9).

Michoacán cuenta con un vasto número de especies vegetales. Especies que crecen y se desarrollan en ecosistemas muy diversos. De estas es muy poca la cantidad de plantas que han sido estudiadas para conocer su conformación química (10).

En este trabajo se buscaron compuestos activadores de la SDH obtenidos de plantas nativas del estado de Michoacán. Estos activadores serán candidatos para prevenir la formación de catarata ocular causada por hiperglicemia.

2 Metodología

2.1 Purificación de compuestos

La purificación de compuestos se realizó con cromatografía en columna siguiendo la metodología utilizada por García-Sánchez *et al.* (2011). Gel de sílice (200-400 mesh) de la marca MERCK se utilizó como fase estacionaria. Mezclas de hexano y acetato de etilo se utilizaron como fase móvil a proporciones de 2:8, 4:6, 6:4 y 8:2 con un volumen final de 135 ml. Estas se pasaron por la columna iniciando con 135 ml de hexano y siguiendo con él orden de las mezclas en de polaridad ascendente. Fracciones de 15 ml aproximadamente se recolectaron. Los compuestos puros fueron caracterizados con Cromatografía en capa fina (CCF) y Resonancia Magnética Nuclear (RMN) (Varian Mercury plus 400 (11)).

2.2 Actividad de la enzima SDH

La enzima se obtuvo de forma comercial. La actividad enzimática se midió siguiendo al método establecido por Aslan con algunas modificaciones. La mezcla de reacción contenía solución amortiguadora de glicina NaOH a pH 10 (50 mM), sorbitol (100 mM), NAD⁺ (0.47 mM), DMSO, SDH y compuesto puro disuelto en DMSO (1mg/ml) a un volumen final de 1 ml. La mezcla de reacción del blanco no contenía sorbitol. El incremento de NADH se midió por el incremento en la absorbencia a 340 nm por 2 min en un espectrofotómetro UV visible (Cary 50 Bio, Varian). El blanco no contuvo sorbitol. El valor obtenido del blanco se restó al valor obtenido de la muestra (12).

2.3 Actividad inhibitoria o activadora

La actividad inhibitoria o activadora se obtuvo adicionando compuestos puros a la mezcla de reacción a una concentración de 0.1 µg/ml. Una mezcla sin sustrato se utilizó como blanco. El porcentaje de inhibición se calculó tomando como 0% de inhibición a la actividad enzimática sin

el inhibidor. El valor de activación se obtuvo tomando como 1 el doble de la actividad enzimática sin el inhibidor.

2.4 Docking molecular

Docking molecular flexible se realizó en el programa Autodock Vina (13) La estructura 3D de la enzima se obtuvo del PDB (www.rcsb.org) con el código 1PL6. A esta estructura se le eliminó el ligando y las moléculas de agua, se le aplicaron cargas y se minimizó su energía. Las estructuras de los compuestos se dibujaron en el programa Maestro Elements (14)

3. Resultados y discusión

La *Diabetes mellitus* es una enfermedad crónico-degenerativa que durante muchos años ha hido en incremento hasta el punto de ocupar el 3er lugar de causa de muerte en México y una de las primeras causas de incapacidad en las personas (15). La alteración en esta enfermedad radica en la falta de cuidados como son llevar una dieta alta en carbohidratos, lo cual genera la incidencia de complicaciones secundarias de la *Diabetes mellitus*. Entre estas complicaciones encontramos la formación de catarata ocular. La vía de los polioles es una de las principales causas de que estas complicaciones se lleven a cabo. La SDH es la enzima responsable de la segunda reacción de la vía de los polioles. Inicialmente se creía que la inhibición de la enzima ayudaría a decrementar la incidencia de catarata (16). Nuestra propuesta es activar la enzima para con ella decrementar el producto y evitar el estrés osmótico causante del daño celular. Se realizó la búsqueda de posibles sitios alostéricos en la SDH. Esta se realizó en la base de datos CASTp para este ensayo se utilizó la enzima 1PL7 obtenida del PDB. El resultado obtenido fueron 144 pockets o posibles sitios alostéricos. Un sitio alostérico es una zona en la enzima en la cual puede unirse un compuesto que puede o no generar un cambio en la actividad de la enzima ya sea

inhibiendo o activando. Para determinar si estos sitios alostéricos tenían la posibilidad de que alguno de nuestros compuestos interaccionara ahí se hizo un análisis de tamaño en los diferentes sitios. Sitios menores a 180 Å fueron descartados ya que en este espacio no es posible que entren algunos de nuestros compuestos. Sitios mayores a 200 Å fueron descartados ya que estos espacios corresponden a las zonas entre una subunidad y otra. Con esto se obtuvo que la enzima tiene 25 pockets que presentan el espacio ideal para que ahí interaccione un compuesto.

Un análisis de Docking molecular se realizó entre la SDH y 22 metabolitos secundarios purificados de plantas nativas del estado de Michoacán. El Docking molecular se realizó en el programa Autodock Vina y los resultados fueron visualizados en Discovery Studio. El resultado obtenido fueron energías de afinidad de -8.1 a -6.2 kcal/mol. La zona en donde se dio la interacción se analizó. Tres zonas se dividieron: sitio lejano al sitio activo donde la interacción se dio fuera del pocket del sitio activo, sitio cercano al sitio activo donde la interacción se dio en la zona del sitio activo pero no con los aminoácidos correspondientes al sitio activo y zona del sitio activo donde la interacción se da con los aminoácidos propios del sitio activo. Aquellos compuestos que se unieron en sitios cercanos al sitio activo o en el sitio activo se eligieron debido a el antecedente de que el paso delimitante de la reacción es la disociación entre SDH y NADH por lo que si el compuesto interacciona en el sitio activo o cercano a este pudiera inducir a la disociación de este complejo. Mezcla de triterpenos (acetato de lupeol, α y β amirina), 10-Acetoxi-6-metoxi-8,9-epoxitamol isobutirato, Lupeol, Escualeno, Encecalinol, Ácido 3-oxo- γ -cóstico, Encecalina, Metilripariocromeno A, UMSNH2014 y Mezcla de triterpenos (α y β amirina) son los compuestos que presentaron interacción cercana o en el sitio activo.

Con estos compuestos se realizó la reacción enzimática de la SDH en presencia del compuesto. La reacción se realizó con SDH comercial a un pH de 10. El sorbitol fue usado como sustrato y se

midió el ascenso de la absorbencia a 340 nm por 2 minutos. Los compuestos fueron disueltos en DMSO. Algunos compuestos generaron inhibición y otros generaron activación. Mezcla de triterpenos (acetato de lupeol, α y β amirina), 10-Acetoxi-6-metoxi-8,9-epoxitimol isobutirato, Lupeol, Escualeno, Encecalinol, Ácido 3-oxo- γ -cóstico, Encecalina, Metilripariocromeno A, UMSNH2014 y Mezcla de triterpenos (α y β amirina) son los compuestos que activaron a la enzima. El encecalinol es el compuesto que activo mayormente a la enzima casi con el doble de actividad comparada con la actividad enzimática sin activador. Los resultados fueron analizados y se ve que todos los compuestos que generaron activación en la enzima interaccionan con el NADH con lo que podríamos deducir que el compuesto pudiera estar induciendo la disociación entre la enzima y su cofactor.

La reacción enzimática se midió en presencia de concentraciones crecientes de los compuestos activadores. Los resultados obtenidos se muestran en la imagen 26. Donde se observa que la Encecalina, Encecalinol, 3-oxo- γ -cóstico y la mezcla de triterpenos incrementa su efecto de activación conforme se incrementa la concentración de este.

4. Conclusión

Metabolitos secundarios purificados de plantas nativas de Michoacan generan activación en la SDH en un ensayo *in vitro*.

5. Bibliografía

1. El-Kabbani, O., Darmanin, C., & Chung, R. T. (2004). Sorbitol dehydrogenase: structure,

Figura 26. Interacciones de los compuestos secundarios con el sitio catalítico de la SDH. —.- Puentes de hidrógeno, —.- Fuerzas de van der Waals, —.- Interacciones π - π , —.- Interacciones π - σ , —.- Solitales de hidrógeno, —.- Interacciones negativas

764). Academic Press.

3. Johansson, K., El-Ahmad, M., Kaiser, C., Jörnvall, H., Eklund, H., Höög, J. O., & Ramaswamy, S. (2001). Crystal structure of sorbitol dehydrogenase. *Chemico-Biological Interactions*, 130, 351-358.
4. Lee, A. Y., & Chung, S. S. (1999). Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract. *The FASEB journal*, 13(1), 23-30.
5. Lee YW, Chung SK, Chung Stephen SM, (1995), Demonstration that polyol accumulation is responsible for diabetic cataract by the use of transgenic mice expressing the aldose reductase gene in the lens, *Medical Sciences*, 92, 2780-2784.
6. Brownlee M, (2006), The pathobiology of diabetic complications a unifying mechanism, *Diabetes*, 54, 1615-1625
7. El-Kabbani, O., Darmanin, C., & Chung, R. T. (2004). Sorbitol dehydrogenase: structure, function and ligand design. *Current medicinal chemistry*, 11(4), 465-476.
8. Rune I. LINDSTAD, Leonila F. HERMANSEN and John S. McKINLEY-McKEE (1994), Inhibition and activation studies on sheep liver sorbitol dehydrogenase, *Eur. J. Biochem.* 221, 847-854 (1994)
9. Pagare, S., Bhatia, M., Tripathi, N., Pagare, S., & Bansal, Y. K. (2015). Secondary metabolites of plants and their role: Overview. *Current trends in biotechnology and pharmacy*, 9(3), 293-304.
10. García-Sánchez E, Ramirez-López CB, del Río R.E., Martínez Pacheco MM, (2011), A revisión of *Eupatorium* (Compositae : Eupatorieae) from Michoacan, *Oyton*, 80, 139-146.
11. García-Sánchez E, Ramírez-López CB, Talavera-Alemán A, León-Hernández A, Martínez Muñoz RE, Martínez-Pacheco MM, Gómez-Hurtado MA, Cerda-García-Rojas CM, Joseph-Nathan P, del Río RE, (2014), Absolute configuration of (13*R*)- and (13*S*) labdane

- diterpenes coexisting in *Ageratina jocospecana*, *Journal of Natural Products*, 77, 1005-1012.
12. Aslan, H. E., & Beydemir, Ş. (2017). Phenolic compounds: the inhibition effect on polyol pathway enzymes. *Chemico-biological interactions*, 266, 47-55. Trott, O.; Olson, A.J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem* 2010, 31, 455–461. DOI: 10.1002/jcc.21334.
13. Dassault Systèmes BIOVIA, Discovery Studio Modeling Environment, Release 2017, San Diego: Dassault Systèmes, 2016. URL: <https://discover.3ds.com/>. Gerardo Martínez*, Marián A. Gómez, (2007), CICLODEXTRINAS: COMPLEJOS DE INCLUSIÓN CON POLÍMEROS, *Rev. Iberoam. Polim.*, 8(4), 300-312
14. Barceló, A., & Rajpathak, S. (2001). Incidence and prevalence of diabetes mellitus in the Americas. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 10(5), 300-308.
15. Lindstad, R. I., Hermansen, L. F., & McKINLEY-McKEE, J. S. (1994). Inhibition and activation studies on sheep liver sorbitol dehydrogenase. *European journal of biochemistry*, 221(2), 847-854.

DISCUSIÓN GENERAL

El ojo tiene un mecanismo complejo para lograr llevar a cabo el proceso de visión. Dentro de este proceso de visión el cristalino, presente en el ojo tiene la función de refractar los rayos de la luz para que las imágenes puedan verse nítidamente en la retina. Entre las principales características del cristalino ocular encontramos la ausencia de inervación y aporte sanguíneo. Esta característica fisiológica hace que las células dañadas en esta zona se acumulen y generen de forma gradual la opacidad del cristalino, lo cual impide la entrada de los rayos de luz y con ello el proceso de visión no se logra. La búsqueda de inhibidores de la AR y activadores de la SDH son una opción para prevenir la formación de catarata ocular en pacientes con *Diabetes mellitus*. Aunque por muchos años se han buscado estos compuestos, son pocos los fármacos que tienen un estudio avanzado para su uso en la prevención de catarata. Compuestos de origen sintético presentan inhibición a la enzima pero también presentan toxicidad.

Plantas del género *Eupatorium* son ampliamente encontradas en Michoacán y estas se consideran nativas de nuestro estado. Con el fin de ampliar el campo estudiado de estas especies, se realizó un fraccionamiento de las plantas para obtener compuestos puros que fueron evaluados como IARs. Entre las características que se usaron para elegir un compuesto inhibidor fueron criterios socioculturales: accesibilidad de recolecta, rendimiento de extracto, uso medicinal y abundancia de espécimen, propiedades drug-like así como la potencia del inhibidor (IC_{50}). Con todo ello se eligió al compuesto Metilripariocromeno A para continuar con la investigación. El Metilripariocromeno A es una molécula que comparado con otros inhibidores de la AR (Epalrestat 319.401 g/mol) podría considerarse una molécula pequeña. Esta característica podría favorecer al momento de absorción de la molécula para lograr llegar a su sitio de acción. Ensayos farmacocinéticos y farmacodinámicos del Metilripariocromeno A de forma *in vivo* son necesarios

para evaluar si este compuesto logra llegar a través de una forma de administración oftálmica a su sitio de acción e inhibir la formación de catarata. La acción de un fármaco de forma *in vivo* no siempre es igual a la obtenida de forma *in vitro* o *ex vivo*. Hasta este punto, se generán las cuestiones de si el Metilripariocromeno A mantendrá su actividad IAR al ser administrado de forma intraocular en un organismo vivo, definir si se logra la inhibición de la formación de catarata, establecer las reacciones adversas que este compuesto genera en su sitio de acción y establecer la concentración optima del Metilripariocromeno A para que se logre su entrada a su sitio de acción y su efecto en esta zona.

Las condiciones del ojo para la absorción de fármacos son diferentes al resto del organismo. Diversas barreras deben ser superadas para que logre entrar un fármaco al interior del ojo en especial al cristalino. En ocasiones esta parte depende de la concentración del fármaco donde una concentración abundante garantiza la entrada del fármaco. Desafortunadamente al tratarse del ojo muchos fármacos suelen ser agresivos a altas concentraciones. Este es el caso de importantes fármacos ya establecidos como el diclofenaco sódico y también IAR como el fidalrestat (Alexiou *et al.*, 2009). El cual aun no es utilizado en una presentación oftálmica debido a que este genera toxicidad en el ojo.

Las CD son ampliamente usadas en la industria farmacéutica. Diversas funciones cumplen estas moléculas para lograr que un fármaco llegue a su sitio de acción y que cause menor cantidad de reacciones secundarias. A través de Docking molecular se definió que el Metilripariocromeno A tiene mayor afinidad por la CD β . La formación del complejo CD β -Metilripariocromeno se realizó con éxito, lo cual se demostró con su caracterización. Además, se logró inhibir a la AR con este complejo. Unos de los grandes retos al momento de formar un complejo de inclusión con CD son mantener un equilibrio entre la estabilidad del complejo y la disociación de este. Lo ideal es que

el complejo sea lo suficientemente estable para lograr que se mantenga integro hasta llegar a su sitio de acción del fármaco y que a su vez esta estabilidad sea solo la necesaria para que una vez que llegue a su sitio de acción el complejo logre disociarse. Para determinar estas características en el complejo, ensayos de estabilidad y disociación del complejo son necesarios, tanto de forma *in vitro*, como de forma *in vivo*. Con ello se ayudará a definir si es conveniente o no la formación del complejo para que el Metilripariocromeno A tenga efectividad en el tratamiento de prevención de la formación de catarata en pacientes con *Diabetes mellitus*. Diferentes expectativas se generan hasta este punto para el complejo CD β -Metilripariocromeno A. Entre ellas está definir si el complejo logra ser un buen acarreador del metilripariocromeno A de forma *in vivo*, evaluar si se logrará una liberación prolongada del metilripariocromeno A en el sitio de acción y descartar reacciones adversas por el uso de CD para la administración de Metilripariocromeno A.

Los resultados obtenidos en un trabajo previo sugieren que el ácido 13-*epi*-labdanólico genera inhibición de la formación de catarata causada por hiperglucemia, pero a concentraciones mayores de 40 μ M genera toxicidad en las células. Esta toxicidad puede prevenirse con la formación de complejos de inclusión entre el ácido 13-*epi*-labdanólico y CD. La interacción entre la CD y el ácido 13-*epi*-labdanólico se simuló mediante docking molecular. Con ellos se logró definir a la CD β como la ideal para formar el complejo de inclusión. Cada complejo se caracterizó con metodologías espectrofotométricas y con esto se logró definir que si se llevó a cabo la formación del complejo. Se realizó la evaluación de complejo como inhibidor de la formación de catarata y con ello se definió que el ácido 13-*epi*-labdanólico en forma de complejo inhibe la formación de catarata en un ensayo *ex vivo* y no genera toxicidad en la célula. Sin embargo, la variación que existe de un ensayo *ex vivo* y un ensayo *in vitro* es enorme. El comportamiento del complejo de inclusión CD β -Acido 13-*epi* labdanólico en un organismo vivo administrado como presentación

oftálmica es necesario. Una presentación oftálmica con el complejo CD β -Acido 13-*epi* labdanólico se debe diseñar para posteriormente administrar esta presentación en un ensayo *in vivo* utilizando conejos con *Diabetes mellitus* como modelo de estudio. Evaluar si se logra la inhibición de la formación de catarata ocular así como los daños adversos que este pudiera causar en su tránsito hasta el cristalino y evaluar la liberación prolongada que generan las ciclodextrinas son solo algunas cuestiones que quedan por definir.

Otra propuesta para inhibir la formación de catarata en un estado de hiperglucemia es la activación de la enzima SDH, con ello disminuye la acumulación de sorbitol y evitar el estrés osmótico causante del daño celular. La búsqueda de posibles sitios alostericos en la SDH se realizó mediante análisis computacional y exposición a fitometabolitos. La reacción enzimática se midió en presencia de concentraciones crecientes de los compuestos activadores. De los resultados obtenidos se observa que la Encecalina, el Encecalinol, 3-oxo- γ -cóstico y la mezcla de triterpenos incrementa su efecto de activación conforme se incrementa la concentración del compuesto. La propuesta de inhibir la formación de catarata en un estado de hiperglucemia a través de la activación de la SDH no tiene mucho respaldo bibliográfico es decir son muy pocos los estudios que proponen esta idea. Por ello, es necesario realizar un ensayo *ex vivo* que demuestre que se logra la inhibición de la formación de catarata por la activación de la SDH. Las expectativas para esta parte de la investigación son diversas, destacando si la interacción entre los posibles sitios alostericos definidos de forma *in silico* con los compuestos activadores de la enzima se logra en un ensayo *in vitro* o *in vivo*. Establecer si a través de estos activadores de la SDH se logra la prevención de acumulación de sorbitol y con ello la inhibición de la formación de catarata y definir si se generan efectos adversos o respuestas secundarias por la administración *in vivo* de estos compuestos.

CONCLUSIONES GENERALES

Los complejos de inclusión MRChA-CD β y UMSNH2014- CD β inhiben la formación de catarata nuclear experimental mediante el control de la hiperproducción de sorbitol a través de la inhibición de la AR en un ensayo *ex vivo*.

Encecalina, Encecalinol, 3-oxo- γ -cóstico y la mezcla de triterpenos obtenidos de plantas nativas de Michoacán generan activación en la enzima SDH. Estos compuestos son candidatos para continuar la investigación de la búsqueda de compuestos que inhiban la formación de catarata mediante la activación de la SDH.

REFERENCIAS GENERALES

- Alexiou P, Pegklidou K, Chatzopoulou M, Nicolaou I, Vassilis J, (2009), Aldose reductase enzyme and its implication to major health problems of the 21 century, *Current Medicinal Chemistry*, 16, 734-752.;
- Banditelli S., Boldrini E., Giuseppe Vilardo P., Cecconi I., Capiello M., Dal Montr M., Marini I., Del Corso A., and Mura H, (1999), A New Approach Against Sugar Cataract Through Aldose Reductase Inhibitors, *Experimental Eye Research*, 69,5, 533-538
- Barski OA, Tipparaju SM, Bhatnagar A, (2008), The aldo-keto reductase superfamily and its role in drug metabolism and detoxification, *Drug Metabolism Reviews*, 40(4), 553-624
- Ben CB Ko, Barbara Ruepp, Kurt M Bohren, Kenneth H Gabbay, (1997), Identification and characterization of multiple osmotic response sequence in the human aldose reductase gene, *The Journal of Biological Chemistry*, 272(26), 16431-16437
- Browlee M, (2001), Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications, *Nature*, 414, 813-818.

- Brownlee M, (2006), The pathobiology of diabetic complications a unifying mechanism, *Diabetes*, 54, 1615-1625.
- Cheng, H. M., & González, R. G. (1986). The effect of high glucose and oxidative stress on lens metabolism, aldose reductase, and senile cataractogenesis. *Metabolism*, 35(4), 10-14..
- Díaz Flores M, Balza Gutman LA, Ibáñez Hernández A, Pascoe Lira D, Guzmán Greenfel AM, Kumate Rodríguez J, (2004), Aspectos moleculares del daño tisular inducido por la hiperglucemia crónica, *Gac Med Méx*, 140 (4), 437-4Srivastava et al., 2005).
- El-Kabbani, O.; Darmanin, C.; Schneider, T.S; Hazemann, I.; Ruiz, F.; Oka, M.; Joachimiak, A.; Schulze-Briese, C.; Tomizaki, T.; Mitschler, A.; Podjarny, A. Ultrahigh Resolution Drug Design. II. Atomic resolution structures of human aldose reductase holoenzyme complexed with fidarestat and minalrestat: Implications for the binding of cyclic imide inhibitors. *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics* 2004, 55, 805–813. DOI: 10.1002/prot.20001
- García Sánchez E, Ramirez Lopez CB, Rosa Elva del Rio, Martinez Pacheco MM, (2011), A revisión of *Eupatorium* (Compositae : *Eupatorieae*) from Michoacan, *Oyton*, 80, 139-146.
- García Sanchez E, Ramírez L pez CB, Talavera Alema n A, Leo n Herna ndez A, Martínez Muñoz RE, Martínez Pacheco MM, Go mez Hurtado MA, Cerda García- Rojas CM, Joseph Nathan P, Del Río RE, (2014), Absolute configuration of (13R)- and (13S) labdane diterpenes coexisting in *Ageratina jocotepecana*, *Journal of Natural Products*, 77, 1005-1012..
- Heinrich M, Ankli A, Frei B, Weimann C, Sticher O, (1998), Medicinal plants in Mexico: healers´ consensus and cultural importance, *Soc Sci Med*, 47(11), 1859-1871.

- Jaspan JB, Herold K, Bartkus C, (1985), Effects of sorbinil therapy in diabetic patients with painful peripheral neuropathy and autonomic neuropathy, *The American Journal of Medicine*, 79(5, Supplement 1), 24-37. *Meijers et al 2001*
- Jiménez, G. S., Ducoing, H. P., & Sosa, M. R. (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista mexicana de fitopatología*, 21(3), 355-363.
- Kathlee Head ND, (2001), Natural therapies for ocular disorders part two: cataracts and glaucoma, *Alternative Medicine Review*, 6(2), 141-161
- Lee YW, Chung SK, Chung Stephen SM, (1995), Demonstration that polyol accumulation is responsible for diabetic cataract by the use of transgenic mice expressing the aldose reductase gene in the lens, *Medical Sciences*, 92, 2780-2784.
- Mayur, M., Amiroudine, S., & Lasseux, D. (2012). Free-surface instability in electro-osmotic flows of ultrathin liquid films. *Physical Review E*, 85(4), 046301.
- Morales Lopez ME, Martínez Muñoz RE, Ron Echeverría O, Rubio Morales NA, Martínez Pacheco MM, Salgado Garciglia R, (2007), Efect of bornyl-o-deca- 2E,6Z,8E-trienate on growth of several pathogens, *Pharmacologyonline*, 3, 96-103
- Rim THT, Kim M, KimWC, Kim TI, Kim EK, (2014), Cataract subtype
- Ramírez-López CB, García-Sánchez E, León-Hernández A, Raya-González D, Rosa Elva del Rio, Flores García A, Martínez Pacheco MM, (2010), Phytochemical perspective of *Eupatorium spp.*, *Pharmacologyonline*, 3, 682
- Saez, F, Frenete G, Sullivan R, (2003), Epididymosomes and prostasomes: Their roles in posttesticular maturation of the sperm cells, *Journal of Andrology*, 24, 149-154.

- Sahoo, Y., Goodarzi, A., Swihart, M. T., Ohulchansky, T. Y., Kaur, N., Furlani, E. P., & Prasad, P. N. (2005). Aqueous ferrofluid of magnetite nanoparticles: fluorescence labeling and magnetophoretic control. *The Journal of Physical Chemistry B*, 109(9), 3879-3885.
- Vincent TE, Mendiratta S, May JM, (1999), Inhibition of aldose reductase in human erythrocytes by vitamin C, *Diabetes Research and Clinical Practice*, 43, 1-8.
- Srivastava SK, Ramana KV, Bhatnagar A, (2005), Role of aldose reductase and oxidative damage in diabetes and the consequent potential for therapeutic options, *Endocrine Reviews*, 26(3), 380-392.
- De la Fuente JA and Manzanaro S, (2003) *Aldose reductase inhibitors from natural sources*, *Natural Product Reports*, 20, 243–251.
- Suryanarayana P, Saraswat M, Mrudula T, Krishna TP, Krishnaswamy K, Reddy GB, (2005), Curcumin and turmeric delay streptozotocin-induced diabetic cataract in rats, *Investigative ophthalmology & visual science*, 46, 2092-2099. *Brownlee, 2001*
- Tabin, Geoffrey^a; Chen, Michael^b; Espandar, Ladan^a. Cataract surgery for the developing world. *Current Opinion in Ophthalmology* 19(1):p 55-59, January 2008. | DOI: 10.1097/ICU.0b013e3282f154bd.
- Tang WH, Martin K.A, Hwa J, (2012), Aldose reductase, oxidative stress, and diabetic mellitus, *Frontiers in pharmacology*, 3, 1-5.
- Wu, B., Yang, Y., Qin, X., Zhang, S., Jing, C., Zhu, C., & Ma, B. (2013). Synthesis and structure-activity relationship studies of quinoxaline derivatives as aldose reductase inhibitors. *ChemMedChem*, 8(12), 1913-1917.